



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی (M.Sc)

### عنوان:

فراوانی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کوئینولون با واسطه  
پلاسمیدی *qnr* در نمونه های بالینی جدا شده از بیماران بستری در  
بیمارستان های آموزشی شهرهای قزوین و تهران

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر تقی ناصرپور

نگارش:

لیلا نیکوئی



## با سپاس فراوان از

- استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر پیمانی که در طول دوران تحصیل همواره مرا از الطاف و راهنمایی های ارزنده خویش بهره مند نموده و در طول انجام این مطالعه نیز با تلاش های پیگیر خود مرا در تمامی مراحل مساعدت و یاری فرمودند.

- استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر ناصرپور

- استاد گرامی سرکار خانم دکتر اصلانی مهر که با وجود مشغله فراوان با حسن اخلاق در مراحل مختلف این پایان نامه مرا مورد عنایت خود قرار داده و با قبول داوری این رساله بر من منت نهادند.

- اساتید گرامی گروه میکروب شناسی: جناب آقای موسوی، سرکار خانم فتوحی که در طول دوران تحصیل از فضل ایشان بهره مند شدم.

- کارکنان و کارشناسان محترم آزمایشگاه های میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی – مولکولی

- معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی

## تقدیم به پدر و مادر عزیزم:

به مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست، خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نسبیم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند، پروردگارا نه می توانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. پس توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

## چکیده فارسی:

**مقدمه:** کلبسیلا پنومونیه یکی از پاتوژن های گرم منفی فرصت طلبی است که باعث عفونتهای مهم بیمارستانی نظیر عفونت مجاری ادراری، پنومونی، سپتی سمی و عفونتهای بافت نرم می گردد. مطالعات نشان داده است که امروزه در سطح جهان ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کوئینولون ها به شکل سریعی در حال گسترش هستند و مشکلات فراوانی را در ارتباط با درمان عفونتهای بیمارستانی در بخشهای بهداشتی و درمانی ایجاد می نمایند.

**مواد و روش ها:** ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه از ۹ بیمارستان آموزشی شهرهای قزوین و تهران در طی سالهای ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ جمع آوری و با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی و آزمایشگاهی تعیین هویت شدند. در ادامه تمامی ایزوله ها از نظر مقاومت به کوئینولون ها ابتدا به روش دیسک دیفیوژن آگار مطابق توصیه موسسه استاندارد CLSI غربالگری شدند. سپس MIC به روش آگار دایلوشن برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین طبق دستورالعمل CLSI انجام و تفسیر گردید و ایزوله های غیر حساس به کوئینولون ها از نظر وجود ژنهای *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* با استفاده از PCR و Sequencing بررسی شدند.

**یافته ها:** در مجموع ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۱۲۴ (۶۲٪) ایزوله نسبت به یکی از ترکیبات کوئینولونی بکار رفته در این مطالعه غیر حساس بودند که از میان آنها ۴۹ ایزوله (۳۹/۵٪) از نظر تولید ژنهای *qnr* مثبت شدند. نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد که ۳۵ ایزوله (۲۸/۲٪) دارای ژن *qnrB1*، ۹ ایزوله (۷/۳٪) دارای ژن *qnrB4*، ۲ ایزوله (۱/۶٪) دارای ژن *qnrS1* و ۳ (۲/۴٪) ایزوله بطور مشترک دارای ژن های *qnrB1* و *qnrB4* بودند. در این مطالعه *qnrA* یافت نشد.

**نتیجه گیری :** با توجه به میزان شیوع بالای ایزوله های حامل ژنهای پلاسمیدی مقاومت به کوئینولون ها در بیمارستان های مورد مطالعه، شناسائی اولیه این ایزوله های مقاوم و پیگیری آنها به جهت جلوگیری از شیوع هر چه بیشتر آنها ضروری است. همچنین استفاده از راهکارهای درمانی مناسب و تجویز درست و منطقی آنتی بیوتیکها توسط پزشکان در کنترل آنها نیز حائز اهمیت است.

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول : مقدمه و کلیات .....	۱
۱-۱ معرفی و بیان مسئله .....	۱
۱-۱-۱ خصوصیات عمومی .....	۲
۲-۱-۱ کلبسیلا پنومونیه .....	۳
۲-۱ تاریخچه .....	۴
۳-۱ طبقه بندی .....	۵
۴-۱ بیماریزائی و اهمیت بالینی .....	۶
۵-۱ فاکتورهای بیماریزائی .....	۸
۱-۵-۱ آنتی ژن کپسولی .....	۹
۱-۱-۵-۱ انواع آنتی ژن های کپسولی .....	۱۱
۲-۵-۱ آدهزین ها .....	۱۲
۳-۵-۱ لیپولی ساکارید .....	۱۳
۴-۵-۱ سیدروفور .....	۱۳
۵-۵-۱ توکسین .....	۱۴
۶-۱ روش های تایپینگ کلبسیلا پنومونیه .....	۱۴

۱-۶-۱	روش فنوتیپی .....	۱۴
۱-۱-۶-۱	بیوتایپینگ .....	۱۵
۲-۱-۶-۱	سروتایپینگ .....	۱۵
۳-۱-۶-۱	باکتریوسین تایپینگ .....	۱۶
۴-۱-۶-۱	فاژ تایپینگ .....	۱۶
۵-۱-۶-۱	آنتی بیوگرام .....	۱۶
۲-۶-۱	روش های مولکولی .....	۱۷
۱-۲-۶-۱	ریوتایپینگ .....	۱۷
۲-۲-۶-۱	تعیین الگوی پلاسمیدی .....	۱۷
۳-۲-۶-۱	RFLP .....	۱۷
۴-۲-۶-۱	مالتی لوکوس آنزیم الکتروفورز .....	۱۸
۵-۲-۶-۱	الکتروفورز میدان پالسی .....	۱۸
۷-۱	آنتی بیوتیک های کوئینولون .....	۱۸
۱-۷-۱	مقدمه .....	۱۸
۲-۷-۱	تاریخچه کوئینولون .....	۱۹
۳-۷-۱	ساختار و فعالیت .....	۲۱
۴-۷-۱	طبقه بندی .....	۲۷



۲۷	..... طبقه بندی بر مبنای عملکرد
۳۱	..... عوارض جانبی
۳۳	..... مکانیسم عمل کوئینولون ها
۳۴	..... مقاومت های آنتی بیوتیکی
۳۵	..... مقاومت به کوئینولون ها
۳۶	..... مکانیسم مقاومت به کوئینولون ها
۳۶	..... تغییر در مولکول هدف
۴۱	..... مقاومت ناشی از کاهش نفوذپذیری آنتی بیوتیک ها و پمپ های افلاکس
۴۸	..... مقاومت ناشی از ژن های پلاسمیدی
۵۰	..... کسب و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها
۵۱	..... مقاومت ذاتی
۵۱	..... مقاومت اکتسابی
۵۲	..... کنترل و پیشگیری
۵۲	..... درمان
۵۵	..... فصل دوم : اهداف و فرضیات
۵۶	..... هدف اصلی
۵۶	..... اهداف اختصاصی

۳-۲	اهداف کاربردی .....	۵۶
۴-۲	فرضیه ها یا سوال های پژوهش .....	۵۶
	فصل سوم : بررسی متون .....	۵۷
	فصل چهارم : مواد و روش ها .....	۶۱
۱-۴	جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری .....	۶۲
۱-۱-۴	جمع آوری نمونه .....	۶۳
۲-۴	آزمایش های تشخیصی فنوتیپی .....	۶۴
۱-۲-۴	ذخیره سازی سویه های کلبسیلا پنومونیه .....	۶۷
۲-۲-۴	بررسی فنوتیپی حضورژن های مقاومت در ایزوله ها .....	۶۷
	الف) آزمون غربال گری آنتی بیوتیکی .....	۶۷
	ب) تعیین حداقل غلظت مهارى با روش آگار دایلوژن .....	۷۰
۳-۴	جداسازی ژن های <i>qnr</i> .....	۷۳
۱-۳-۴	مراحل انجام آزمون ملکولی .....	۷۳
۱-۱-۳-۴	استخراج DNA .....	۷۴
	مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling .....	۷۵
۲-۱-۳-۴	آماده سازی پرایمر ها .....	۷۷
۳-۱-۳-۴	انجام آزمون PCR .....	۷۷

الف- مواد و وسایل موردنیاز .....	۷۷
ب- آماده سازی Mastermix .....	۷۸
ج-آماده سازی واکنش PCR .....	۷۹
د- برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) .....	۸۰
۴-۱-۳-۴ الکتروفورز محصولات PCR .....	۸۲
مواد و وسایل مورد نیاز .....	۸۲
تهیه بافر TBE 1X .....	۸۲
الکتروفورز .....	۸۳
۴-۴ تعیین توالی .....	۸۴
<b>فصل پنجم : نتایج و یافته ها (Results and Finding) .....</b>	<b>۸۵</b>
۱-۵ ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک شهر و بیمارستان .....	۸۶
۲-۵ بررسی فنوتیپی وجود ایزوله های مقاوم به کوئینولون ها .....	۸۸
۱-۲-۵ تست غربال گری آنتی بیوتیکی .....	۸۸
۳-۵ نتایج جداسازی ژن های <i>qnr</i> .....	۹۴
۴-۵ یافته های آزمون مولکولی .....	۹۶
۵-۵ نتایج تعیین توالی محصولات PCR .....	۹۸
<b>فصل ششم : بحث و پیشنهادات .....</b>	<b>۱۰۱</b>
۱-۶ بحث .....	۱۰۲

۶-۲ نتیجه گیری ..... ۱۰۷

۶-۳ پیشنهادات ..... ۱۰۸

فهرست منابع (References) ..... ۱۰۹

ضمیمه ..... ۱۲۴

چکیده انگلیسی ..... ۱۲۶

## فهرست جداول:

- جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی گونه های شایع جنس کلبسیلا ..... ۴
- جدول ۲: موتاسیون در آمینواسیدهای زیر واحدهای GyrA و GyrB سویه های E.coli مقاوم به کوئینولون .. ۴۰
- جدول ۳: موتاسیون در زیر واحدهای ParC و ParE سویه های E.coli مقاوم به کوئینولون ..... ۴۰
- جدول ۴: پمپ های افلاکس مسئول مقاومت میکروارگانیسم های گرم مثبت ..... ۴۷
- جدول ۵: پمپ های افلاکس مسئول مقاوت کوئینولون در میکروارگانیسم های گرم منفی ..... ۴۷
- جدول ۶: جدول متغیرها ..... ۶۳
- جدول ۷: ترکیب مواد برای تهیه لوله های استاندارد نیم مک فارلند ..... ۶۹
- جدول ۸: مشخصات آنتی بیوتیک های استفاده شده ..... ۷۰
- جدول ۹: تفسیر نتایج MIC سیپروفلوکساسین ..... ۷۳
- جدول ۱۰: پرایمرهای مورد استفاده آزمون PCR ..... ۷۴
- جدول ۱۱: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix یک واکنش PCR ..... ۷۹
- جدول ۱۲: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR ..... ۸۰
- جدول ۱۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر درواکنش PCR برای ژن های مورد نظر ..... ۸۱
- جدول ۱۴: تعداد ایزوله ها به تفکیک شهر ..... ۸۷
- جدول ۱۵: تعداد ایزوله ها به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین ..... ۸۷
- جدول ۱۶: تعداد ایزوله ها به تفکیک بیمارستان های شهر تهران ..... ۸۸

- جدول ۱۷: میزان مقاومت ایزوله ها به آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری ..... ۹۰
- جدول ۱۸: تعداد ایزوله های غیر حساس به تفکیک شهر ..... ۹۰
- جدول ۱۹: تعداد ایزوله های غیر حساس به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین ..... ۹۱
- جدول ۲۰: تعداد ایزوله های غیر حساس به تفکیک بیمارستان های شهر تهران ..... ۹۱
- جدول ۲۱: تعداد ایزوله های غیر حساس به تفکیک نوع نمونه ..... ۹۲
- جدول ۲۲: تعداد ایزوله های غیر حساس به تفکیک بخش های بیمارستان ..... ۹۲
- جدول ۲۳: تعداد ایزوله های غیر حساس به تفکیک جنس ..... ۹۳
- جدول ۲۴: نتایج MIC برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین ..... ۹۳
- نمودار ۱: نمودار نتایج MIC برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین ..... ۹۴
- جدول ۲۵ : فراوانی ژن های *qnr* ..... ۹۵
- جدول ۲۶: فراوانی ژن های *qnr* به تفکیک بخش های مختلف بیمارستان ..... ۹۵
- جدول ۲۷ : فراوانی ژن های *qnr* به تفکیک نوع نمونه ..... ۹۶

## فهرست شکل ها:

- شکل ۱: کلنی های موکوئیدی و تخمیر کننده لاکتوز بر روی محیط مک کانگی آگار کلبسیلا پنومونیه ۳
- شکل ۲: ساختار پایه و شاخه های جانبی مولکول کوئینولون و نافتیریدون ..... ۲۵
- شکل ۳: ساختار اصلی آنتی بیوتیک های کوئینولون که در جایگاه R معمولا حلقه پیرازین قرار می گیرد و در جایگاه F معمولا فلورین قرار می گیرد ..... ۲۵
- شکل ۴: ساختار چند آنتی بیوتیک ..... ۲۶
- شکل ۵: دستگاه میکروسانتریفوژ ..... ۷۶
- شکل ۶: دستگاه ترموسایکلر ..... ۸۱
- شکل ۷: تانک الکتروفورز ..... ۸۳
- شکل ۸: دستگاه Gel-Documentation ..... ۸۴
- شکل ۹: نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده در مطالعه حاضر ..... ۸۶
- شکل ۱۰: آنتی بیوگرام ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ..... ۸۹
- شکل ۱۱: ژل الکتروفورز ژن *qnrB1* ..... ۹۶
- شکل ۱۲: ژل الکتروفورز ژن *qnrB4* ..... ۹۷
- شکل ۱۳: ژل الکتروفورز ژن *qnrS* ..... ۹۸
- شکل ۱۴: تعیین توالی *qnrB1* ..... ۹۹
- شکل ۱۵: تعیین توالی *qnrB4* ..... ۹۹
- شکل ۱۶: تعیین توالی *qnrS* ..... ۱۰۰

# فصل اول

## مقدمه و کلیات



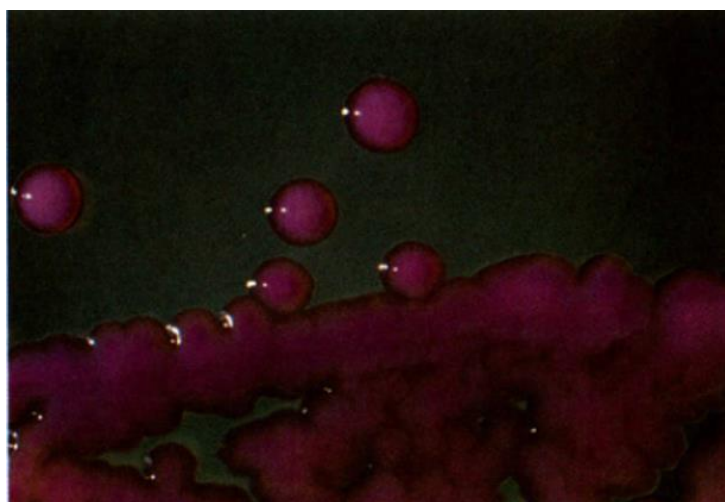
## ۱-۱ معرفی و بیان مسئله

### ۱-۱-۱ خصوصیات عمومی جنس کلبسیلا:

جنس کلبسیلا شامل باسیل های گرم منفی غیر متحرک، اکسیداز منفی، تخمیر کننده گلوکز و لاکتوز، فاقد اسپور با یک کپسول پلی ساکاریدی قابل توجه که به کلنی ها نمای موکوئیدی و براق را بر روی سطح پلیت آگار می دهد، می باشد. این ارگانسیم ها باسیل هائی هستند که ۱-۳/۰ میکرومتر قطر و ۶-۶/۰ میکرومتر طول دارند که به صورت جفت یا باسیل های تکی دیده می شوند. گونه های کلبسیلا بی هوازی اختیاری بوده و هر دو نوع متابولیسم تخمیری و تنفسی را انجام می دهند. کلنی های بزرگ موکوئیدی و قرمز رنگ را بر روی محیط مک کانگی آگار (Mac Conkey Agar) بدلیل تخمیر لاکتوز و تولید اسید ایجاد می کند. اکثر گونه های کلبسیلا فلور نرمال دستگاه گوارش انسان، حیوان، خاک، آب و محیطهای گیاهی هستند. آدنیتول، اینوزیتول، مانیتول، سالیسیلین و همچنین اغلب لاکتوز را تخمیر می کنند. بسیاری از ایزوله های این جنس از تخمیر قندها گاز تولید می کنند. MR (Methyl Red) منفی و VP (Voges Proskauer) مثبت بوده اما گونه هایی از این جنس که اغلب از مجاری تنفسی جدا می گردند در بعضی مواقع واکنشهای بیوشیمیایی متفاوتی نشان می دهند و ممکن است واکنش های بیوشیمیایی دیگری داشته باشند. اغلب بر روی محیط سیمون سترات و سیانید پتاسیم رشد می کنند. دامیناسیون فنیل آلانین در این ارگانسیم ها منفی بوده به استثنای یک تعداد از این باکتری ها، اغلب فاقد ژلاتیناز می باشند. محتویات G+C در این جنس ۵۸-۵۲٪ و گونه شاخص در این جنس کلبسیلا پنومونیه می باشند (۱).

## ۱-۱-۲ کلبسیلا پنومونیه:

این باکتری همانند دیگر گونه های کلبسیلا غیر متحرک و کپسول پلی ساکاریدی شاخصی را تولید می کند (شکل ۱). این ارگانیسم ها اوره آز، لیزین دکربوکسیلاز مثبت بوده و در آزمون های اورنیتین دکربوکسیلاز، آرژنین دهیدرولاز و تولید اندول، منفی می باشند. تست VP در این گونه مثبت می باشد. این ارگانیسم در محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar) به صورت اسید اسید، بدون تولید گاز سولفید هیدروژن و همچنین تولید کننده گاز می باشد (جدول ۱). در حرارت مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه از بین می رود. در خشکی برای چندین ماه زنده می ماند و زمانیکه کشت ها در دمای اتاق نگهداری می شوند هفته ها یا ماه ها زنده می ماند. رشد این باکتری با آنکه بیهوازی اختیاری می باشد در شرایط بیهوازی مطلق ضعیف است. فاقد توانائی لیز گلبول های قرمز خون بر روی محیط بلاد آگار حاوی خون اسب و گوسفند می باشد. دمای رشد بهینه این ارگانیسم ۳۷ درجه سانتی گراد و در دمای بین ۴ تا ۴۳ درجه سانتی گراد قابلیت رشد دارد (۲).



شکل ۱: کلنی های موکوییدی و تخمیر کننده لاکتوز بر روی محیط مک کانگی آگار کلبسیلا پنومونیه

یکی از خصوصیات منحصر به فرد در کلبسیلا پنومونیه تثبیت نیتروژن می باشد. تنها جنس در خانواده انتروباکتریاسه بوده که توانایی تثبیت نیتروژن موجود در اتمسفر هوا و تبدیل آن به آمونیاک و اسیدهای آمینه را دارد (۳). یکی دیگر از محصولات متابولیکی این باکتری 1,3-propanediol می باشد که در شرایط بی هوازی یا میکروآئروفیل تولید می کند (۴).

جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی گونه های شایع جنس کلبسیلا

Test or Substrate	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>			<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>		
	Sign	% +	(% +)	Sign	% +	(% +)	Sign	% +	(% +)
Urease	+	95.4	(0.1)	+	90		D	0	(14.8)
Indole	-	0		+	99		-	0	
Methyl red	- or +	10		-	20		+	97.7	
Voges-Proskauer	+	98		+	96		-	0	
Citrate (Simmons)	+	98	(0.6)	+	95		D	30	(32.4)
Gelatin (22° C)	-	0	(0.2)	-	0		-	0	
Lysine decarboxylase	+	98	(0.1)	+	99		- or +	40	(6.3)
Malonate	+	92.5		+	98		-	6	
Mucate	+	90		+	93		- or +	25	
Sodium alginate (utilization)	+ or (+)	88.5	(9.2)	nd			- or (+)	0	(11)
Gas from glucose	+	96		+	97		d	50	(9.4)
Lactose	+	98.7	(1)	+	100		d	30	(61.3)
Dulcitol	- or +	30		+ or -	55		-	0	
Organic acid media									
Citrate	+ or -	64.4		nd			- or +	18	
D-Tartrate	+ or -	67.1		nd			- or +	39	

Modified from Ewing WH: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, ed 4, East Norwalk, Conn, 1986, Appleton and Lange.  
 +, ≥90% positive within 1 or 2 days; (+), positive reaction after 3 or more days (decarboxylase tests: 3 or 4 days); -, ≥90% no reaction in 30 days; + or -, most cultures positive, some strains negative; - or +, most strains negative, some cultures positive; d, different reactions; +, (+), -, nd, no data.

## ۱-۲ تاریخچه

در سال ۱۸۸۰ یکی از سویه های این جنس برای اولین بار توسط یک میکروب شناس آلمانی بنام ادوین کلبس (Edwin Klebs) مشاهده شد و به همین جهت باکتری های این جنس را کلبسیلا نامیدند. در سال ۱۸۸۲ *Friedlander c. uber* اولین بار کلبسیلا را به عنوان پاتوژنی که سبب پنومونی می شود کشف کرد، به

همین دلیل به آن باسیل فرید لندر هم می گویند (۵). کلبسیلا پنومونیه یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می باشد که به عنوان عامل پنومونی اکتسابی از جامعه شناخته شده است.

### ۱-۳ طبقه بندی

از نظر طبقه بندی کلبسیلا پنومونیه در:

Domain: Bacteria

Phylum: Protobacteria

Class: Gamma protobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: Klebsiella

Species: Pneumoniae

قرار دارد (۶).

جنس کلبسیلا به طور کلی بر اساس واکنشهای بیوشیمیائی و اهمیت بالینی در ۳ گونه اصلی طبقه بندی می شود که شامل کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اوزونه و کلبسیلا رینواسکلروماتیس می باشد. بر مبنای داده های بدست آمده از هیبریداسیون DNA-DNA کلبسیلا اوزونه و رینواسکلروماتیس از نظر طبقه بندی به عنوان زیر گونه های کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته می شوند (۷). کلبسیلا اکسی توکا ابتدا از شیر جدا شد و بیشتر به عنوان یک گروه متمایز از کلبسیلا پنومونیه طبقه بندی می شود (۸). چهار گونه جدید دیگر در این جنس

شامل: *K. planticola* and *K. terrigena*, *K. trevisanii*, *K. ornithinolytica* در دهه ۱۹۸۰ به ترتیب مورد شناسائی قرار گرفتند (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). *K. planticola* و *K. trevisanii* متعاقباً با یکدیگر ترکیب شدند و بر مبنای هیبریداسیون DNA-DNA به عنوان *K. planticola* در نظر گرفته شدند (۱۳). ۳ گونه *K. planticola* *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* اخیراً در جنس جدیدی در خانواده انتروباکتریاسه به نام *Raoultella* قرار گرفته اند (۱۴). ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه بر مبنای تغییرات نوکلئوتیدی در ژنهای *parC*, *gyrA* و *rpoB* در ۴ گروه تقسیم می شوند که شامل: *KP I*, *KP II-A*, *KP II-B*, *KP III* می باشد. همچنین گونه جدیدی تحت عنوان *K. variicola* توصیف شده که در گروه *KP III* قرار گرفته است (۱۵).

## ۱-۴ بیماریزائی و اهمیت بالینی

مهمترین گونه بیماریزا در جنس کلبسیلا، کلبسیلا پنومونیه می باشد. در سالهای اخیر کلبسیلاها از پاتوژنهای مهم در عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند (۱۵). کلبسیلا پنومونیه همچنین پاتوژن بالقوه بیماریزای کسب شده از جامعه می باشد (۱۶). باکتری های گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک ها بواسطه تولید *ESBL* با افزایش مرگ و میر، طولانی شدن مدت بستری و افزایش هزینه های بیمارستانی مرتبط هستند (۱۷). در انسان ها گونه های کلبسیلا بر روی پوست، حلق یا دستگاه گوارش استقرار می یابند. این باکتری در زخمهای استریل، ادرار استقرار پیدا کرده و ممکن است به عنوان فلور نرمال قسمت هایی از روده باریک و مجاری صفراوی هم در نظر گرفته شود (۱۸). انتقال کلبسیلا از یک بیمار به یک بیمار دیگر از طریق وسایل آلوده پزشکی، دست های آلوده پرسنل بیمارستان و محصولات خونی صورت می گیرد، در حالیکه مناطق ایجاد کننده عفونت توسط گونه های کلبسیلا، زخم های جراحی، پریتونوم، مکان های ورود کاتتر، مجاری ادراری، دستگاه

گوارش و مجاری صفراوی می باشد (۱۹). کلبسیلا پنومونیه باکتری فرصت طلب و پاتوژن مهم کسب شده از بیمارستان و عامل عفونت های مجاری ادراری، آرتريت نوزادان، مننژیت، عفونت زخم ها، پنومونی بیمارستانی، باکتری می، سپتی سمی و عفونت های بافت نرم می باشد (۱۶). پنومونی کسب شده از بیمارستان یک بیماری شدید با مرگ و میر بالا همراه با تهاجم سریع، تب بالا، خلط خونی و آبسه های قابل مشاهده در رادیوگرافی قفسه سینه می باشد. میزان مرگ و میر در حدود ۲۵ تا ۵۰٪ می باشد (۲۰). میزان مرگ و میر در بین بیماران دچار سرکوب سیستم ایمنی یا دیابت بالا، در حدود ۵۰-۱۰۰٪ می باشد. باکتری می کسب شده از جامعه معمولاً "به دنبال عفونت های مجاری ادراری، عفونت کاتترهای عروقی و التهاب مجاری صفراوی رخ می دهد (۱۶). علاوه بر آن در گونه های کلبسیلا بویژه کلبسیلا پنومونیه نشان داده شده که عامل عفونت های داخل شکمی ناشی از تولید توکسین های حساس و مقاوم به حرارت می باشند (۲۱). در سال ۱۹۸۱ یک سندرم ایجاد شده توسط کلبسیلا پنومونیه کسب شده از جامعه در تایوان گزارش شد که سپتی سمی همراه با آبسه های کبدی بود. این سندرم همراه با میزان مرگ و میر بالا (۱۰ تا ۴۰٪) بوده و بعضی از درگیری های مرتبط با این سندرم که به شکل مننژیت و اندوفتالمیتیس می باشد، در این سندرم مشاهده شده است (۲۲). این بیماری از آمریکای شمالی و اروپا هم گزارش شده است (۶). علائم این بیماری شامل: خستگی، بی اشتها، حالت تهوع، درد منتشر شکمی، درد پلور، زردی و تب می باشد (۲۳). سروتیپ K1 کپسولی سروتیپ غالب کلبسیلا پنومونیه در ایجاد آبسه های کبدی می باشد (۲۴). در تایوان و کره جنوبی سروتیپ کپسولی K1 در حدود ۶۰٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ایجاد کننده آبسه کبدی مشاهده شد (۲۶، ۲۵). ژن *rmrA* (Mocuviscosity Associated Gene A) در ارتباط با خصوصیت فنوتیپی افزایش چسبندگی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ایجاد کننده آبسه کبدی در تایوان بوده است. رحیمیان و همکارانش مشخص کرده اند که آبسه های کبدی

معمولاً" در بیماران با ملیت آسیایی رخ می دهد که نشان دهنده ارتباط احتمالی ژنتیکی با حساسیت به این بیماری می باشد (۲۷). وجود بیماری های زمینه ای متنوع شامل دیابت، مصرف بیش از حد الکل، بیماری های مجاری صفراوی، بدخیمی ها، سیروز کبدی، بیماری های کلیوی، عفونت های داخل شکمی، تاریخچه مصرف استروئیدها، تاریخچه جراحی های ناحیه شکم و تاریخچه مصرف آنتی بیوتیک ها همه به عنوان فاکتورهای خطر برای عفونت آبسه کبدی ناشی از سروتیپ کپسولی K1 در کلبسیلا پنومونیه می باشد (۲۸). کلبسیلا پنومونیه از عوامل شایع ایجاد کننده مننژیت باکتریال کسب شده از جامعه در بالغین کشور تایوان می باشد (۲۹). در خارج از کشور تایوان موارد مننژیت ناشی از کلبسیلا پنومونیه به طور غالب بیشتر از دیگر نقاط آسیا، اروپا و آمریکای شمالی دیده شده است (۳۰،۳۱،۳۲). کلبسیلا پنومونیه به عنوان پاتوژن شایع ایجاد کننده اندوفتالمیت باکتریال با منشأ داخلی مرتبط با آبسه کبدی در آسیا می باشد (۳۳). کلبسیلا پنومونیه سروتیپ کپسولی K1 توانائی ایجاد عفونت در سیستم عصبی مرکزی به عنوان عارضه ای از آبسه های کبدی چرکی در بیماران دارای بیماری های زمینه ای دارد (۳۴). موارد آرتریت سپتیک حاد در نتیجه عفونت با کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL در بیماران بالغ بدنبال عفونت بیمارستانی گزارش شده است. کلبسیلا پنومونیه همچنین با اسهال مزمن در افراد HIV مثبت مرتبط است (۳۵).

## ۱-۵ فاکتورهای بیماریزائی

با بررسی مکانیسم های بیماریزایی عفونت های کلبسیلایی، تعدادی از فاکتورهای ویروالانس این باکتری شناسایی شده اند. استفاده از مدل های حیوانی، نقش مهمی در مطالعه بیماریزایی کلبسیلا داشته و از این طریق

می توان اطلاعات مهمی که از مطالعات *Invitro* نمیتوان به دست آورد، را کسب نمود. بر طبق مطالعات انجام شده، ۵ فاکتور برای بیماریزایی کلبسیلا مطرح شده است.

#### ۱-۵-۱ آنتی ژن کپسولی:

کپسول پلی ساکاریدی به عنوان مهمترین فاکتور بیماریزایی کلبسیلا پنومونیه مورد شناسایی قرار گرفته است. کپسول از واحدهای تکراری قندهای ۴ تا ۶ کربنه (گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فوکوز و رامنوز) و اغلب اسیدهای ارونیک (به عنوان ترکیبات دارای شارژمنفی) تشکیل شده است (۱۸). کپسول پلی ساکاریدی تیپ ۲ حاوی گلوکز، مانوز و N-استیل گلوکورونیک اسید می باشد (۳۶). مواد کپسولی به شکل دسته های فیبرینی در سطح پوشش باکتری به منظور محافظت باکتری از فاگوسیتوز بواسطه ماکروفاژ و جلوگیری از کشته شدن باکتری بوسیله فاکتورهای سرمی باکتریسیدال گسترده شده اند (۱۸). مطالعات آزمایشگاهی نشان می دهد که وجود کپسول پلی ساکاریدی مانع از رسوب جزء C3 کمپلمان بر سطح باکتری شده و سبب کاهش اتصال و فاگوسیتوز باکتری توسط ماکروفاژها و سلول های اپی تلیال می گردد (۳۷). سروتیپ های کپسولی K1 و K2 مقاومت سطح بالا در مقابل فاگوسیتوز بواسطه ماکروفاژها دارند. در مقابل ایزوله های فاقد این تیپ های کپسولی معمولاً "مقاومت نسبت به فاگوسیتوز نداشته و بیماریزایی کمتری دارند (۳۸). سروتیپ های کپسولی K1 و K2 سروتیپ های غالب به ویژه در کلبسیلا پنومونیه می باشد. سروتیپ K1 اغلب مرتبط با پنومونی حاد می باشد (۱۸). وجود این کپسول در سطح کلبسیلا پنومونیه ممکن است به عنوان یک سد محافظتی در مقابل پپتیدهای ضد میکروبی (Aps) مانند لیزوزیم و لاکتوفرین باشد. غلظت های sub-lethal پپتیدهای ضد میکروبی باعث افزایش رونویسی از اپرون cps می شود که در ارتباط با افزایش تولید کپسول پلی ساکاریدی در سطح باکتری می باشد (۳۹). علیرغم اینکه کپسول به عنوان مهمترین فاکتور بیماریزا در سویه



های کلبسیلا پنومونیه شناخته شده است، سویه های بدون کپسولی هم که قدرت بیماریزایی داشته اند نیز گزارش شده اند. بر طبق مطالعات انجام شده تولید کلونی های موکوئیدی به عنوان یک فاکتور اصلی برای تثبیت بیماریزایی در این سویه ها شناخته شده است. ژن مربوط به تولید این کلونی های موکوئیدی توسط پلاسمید کد شده و به کپسول پلی ساکاریدی و کلونیک اسید هم مربوط نمی شود (۴۰). رسپتورهای مانوز بر روی سطح ماکروفاژ، توالی های مانند  $\text{Man-}\alpha\ 2/3\ \text{Man}$  و همچنین  $\text{Rah-}\alpha\ 2/3\ \text{Rah}$  را بر روی سطح کپسول تعدادی از سروتیپ های کپسولی تشخیص می دهند. بنابراین بخش عمده ای از حذف سریع برخی از سروتیپ های کپسولی در مجاری تنفسی ممکن است بخاطر تشخیص مستقیم ارگانیسم توسط فاگوسیتوز وابسته به رسپتور های مانوزی باشد (۴۱). فرضیه مقاومت سرمی هم که برای کلبسیلا مطرح می شود به این صورت می باشد (۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵):

الف) کپسول پلی ساکاریدی می تواند روی  $\text{LPS}$  را پوشانده و ساختمان سطحی را بوجود آورد که مانع فعالیت کمپلمان گردد.

ب) ممکن است زنجیره جانبی  $\text{O}$  لیپو پلی ساکارید، از میان لایه کپسولی بیرون آمده و در معرض محیط خارجی قرار گیرد و با توجه به اینکه  $\text{LPS}$  معمولاً قادر به فعال ساختن کمپلمان است، در نتیجه  $\text{C}_3\text{b}$  بر سطح مولکول های  $\text{LPS}$  رسوب می نماید و از تشکیل کمپلکس کشنده حمله به غشا ( $\text{C}_5\text{b-C}_9$ ) و در نهایت از آسیب به غشا و مرگ سلولی جلوگیری به عمل خواهد آمد (۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵).

در نهایت Edvard در سال ۲۰۱۰ بیان کرد که کلبسیلا پنومونیه تولید کننده کپسول بواسطه ممانعت از اتصال و بلعیدن باکتری ها سبب نقص در پاسخ ایمنی شامل بلوغ دندرتیک سل ها و تولید سایتوکین های سلول های Th1 می شود (۴۶).

#### ۱-۵-۱-۱ انواع آنتی ژنهای کپسولی:

بر اساس پلی ساکارید کپسولی که آنتی ژن K نامیده می شود، کلبسیلا پنومونیه دارای ۷۷ تیپ آنتی ژن می باشد. تیپ های کپسولی K1، K2، K4 و K5 دارای ویرولانسی بیشتری در عفونت های تجربی در موش می باشند. همچنین اغلب عفونت های شدید کلبسیلا پنومونیه در نمونه های انسانی و حیوانی در ارتباط با این سروتیپ های کپسولی می باشد. ایزوله های K1 در نمونه های پنومونی فرید لاندر و همچنین آبسه های کبدی ، فراوان ترین تیپ کپسولی هستند که جدا می شوند. تیپ ۳ کپسولی نیز همیشه در ارتباط با نمونه های رینو اسکلروما گزارش می شود (۴۷). تیپ ۴ و بندرت تیپ ۵ کپسولی در ارتباط با نمونه های رینیت آتروپیک ایجاد شده توسط سویه های کلبسیلا پنومونیه زیر گونه اوزونه می باشند (۴۷). در میان تمام سرو تیپ ها، سروتیپ های کپسولی K1 و K2 در سویه های کلبسیلا پنومونیه به عنوان غالب ترین سروتیپ های بیماریزا به خصوص در ایجاد آبسه های کبدی و اندوفتالمیت گزارش می شوند. از جمله ترکیباتی که سبب کاهش تولید کپسول در سویه های کلبسیلا پنومونیه می شود، می توان به بیسموت و سالیسیلات اشاره کرد. این ترکیبات به دنبال کاهش تولید کپسول در این سویه ها، جذب فاگوسیتی باکتری را هم افزایش می دهند. تاثیر این ترکیبات بر روی کپسول کلبسیلا پنومونیه به عنوان اولین فاکتور بیماریزا در این باکتری ها، می تواند بیانگر پتانسیل عملکردی این ترکیبات به صورت دارو باشد (۴۰).

اتصال به لایه های مخاطی و سلول های اپی تلایل اغلب اولین مرحله برای گسترش و استقرار عفونت می باشد. ادهزین ها اغلب دارای خاصیت هماگلوتیناسیون هستند. آنها را بر اساس اینکه آیا واکنش اتصالشان به سلول میزبان با حضور D-مانوز مهار می شود یا خیر، به دو گروه حساس به مانوز و مقاوم به مانوز تقسیم می شوند. بیش از ۸۰٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه فیمبریه نوع ۱ را بیان می کنند (۴۸). این نوع پیلی هماگلوتینین حساس به مانوز بوده و گلبول های خوکچه هندی را آگلوتینه می نماید. ایزوله های کلبسیلا پنومونیه معمولاً سه نوع پیلی تولید می کنند که شامل پیلی نوع ۱، ۳ و ۶ می باشد. مطالعات نشان می دهد که پیلی نوع ۱ فاکتور بیماریزای مهمی در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ایجاد کننده عفونت ادراری، پیلونفریت و پنومونی می باشد زیرا باعث اتصال باکتری به سلول های مخاطی و یا اپیتلیال مجاری ادراری-تناسلی و گوارشی می شود (۴۰، ۴۹، ۵۰). همچنین معتقدند که پیلی نوع ۳ در تشکیل ساختارهایی تحت عنوان بیوفیلم شرکت می کند. بیوفیلم ساختاری است که سبب مقاومت باکتری در مقابل مکانیسم های دفاعی میزبان و اثرات آنتی بیوتیک ها می شود (۵۱). این نوع پیلی مقاوم به مانوز بوده و تنها اریتروسیت هایی که با اسید تانیک تیمار شده اند را آگلوتینه می کند. سویه های کلبسیلا پنومونیه با پیلی تیپ ۳ می توانند به سلول های اپیتلیال و اندوتلیال دستگاه ادراری و تنفسی متصل شوند. این پیلی در کلیه ها موجب چسبندگی باکتری به غشاء پایه توبولی، کپسول لومن و عروق کلیوی می شود (۴۰، ۵۲). ادهزین k29CF که بر روی پلاسمید حامل ژن های مقاومت (پلاسمید R) حمل شده و باعث چسبندگی باکتری به رده های سلولی انسانی ۴۰۷ روده و Caco-2 در کشت سلولی می باشد (۴۰). ادهزین دیگر که تحت عنوان ادهزین تجمعی (Aggregative adhesion) خوانده می شود به نظر می رسد که ترکیبی از ماده خارج سلولی شبه کپسولی باشد که با الگوی چسبندگی

خاصی به سلول روده ای می چسبد. ادهزین دیگر از نوع فیمبریه ای (پیلی) که عامل کلونیزاسیون باکتری در روده انسان است، KPF-28 نام دارد.

### ۱-۵-۳ لیپولی ساکارید:

لیپولی ساکارید از سه ناحیه مشخص تشکیل شده که به ترتیب از داخل به خارج شامل: لیپید A، پلی ساکارید مرکزی و آنتی ژن O می باشد. ۹ سروتیپ از آنتی ژن O در کلبسیلا پنومونیه شناسائی شده که سروتیپ O1 غالب می باشد. آنتی ژن O در کلبسیلا پنومونیه نقش مهمی در حفاظت آن در مقابل اثر کشندگی کمپلمان ایفا می کند (۱۸). لیپید A در لایه بیرونی غشاء خارجی شناور است و به عنوان اندوتوکسین سبب تحریک پاسخ ایمنی بواسطه انتقال پیام از طریق 4-Toll-like receptor (TLA4) سطح ماکروفاژها و دندریتیک سل ها می گردد. ناحیه مرکزی سبب اتصال آنتی ژن O به لیپید A شده و بدلیل دارا بودن گروه های فسفات دارای شارژ منفی می باشد (۵۳).

### ۱-۵-۴ سیدروفورها

آهن عنصر اساسی برای رشد باکتری ها می باشد که در ساختار آنزیم ها و فرایند انتقال الکترون و اکسیژن شرکت دارد (۵۴). باکتری ها از طریق ترشح مولکول هایی با وزن مولکولی پائین به نام سیدروفورها که قدرت اتصال زیاد به آهن را دارند، آهن مورد نیاز برای رشد خود را تامین می کنند. دو گروه مختلف از سیدروفور توسط جنس کلبسیلا تولید می شود که شامل: فنولات ها (انتروباکتین) و هیدروکسامات ها (آئروباکتین) می باشد. اکثر جنس های خانواده انتروباکتریاسه انتروباکتین ترشح می کنند اما تعداد کمی آئروباکتین تولید می نمایند. بر طبق بررسی های انجام شده در سال ۱۹۸۶ مشاهده شد که بین ژن آئرو باکتین و شدت بیماریزایی

سویه های کلبسیلا پنومونیه ارتباط مستقیم وجود دارد، به گونه ای که با انتقال ژن آئروباکتین کلون شده در پلاسمید تعدادی از سویه های کلبسیلا پنومونیه K1 و K2 به سویه های فاقد بیماریزایی و سیدروفور منفی، افزایش چشمگیری در بیماریزایی در مدل حیوانی مشاهده گردید (۵۴). گونه های کلبسیلا یک نوع دیگر از سیدروفور تحت عنوان یرسینا باکتین تولید می کنند که نقش آن در بیماریزائی هنوز کاملاً " مشخص نمی باشد (۱۸).

مطالعه ای نشان داده است که ایزوله های کلبسیلا پنومونیه که ترشح کننده یرسینا باکتین هستند، افزایش بیان در آنزیم های ESBL دارند (۵۵).

#### ۱-۵-۵ توکسین

سویه های کلبسیلا پنومونیه، انتروتوکسین مقاوم در برابر حرارتی را تولید کرده که در نتیجه ترشح آن در روده کوچک، ترشح آب و الکترولیت ها به داخل روده زیاد شده و منجر به بروز اسهال می گردد. این توکسین شبیه به توکسین مقاوم به حرارت ST در اشرشیا کلی است و احتمال می رود که پلاسمید حاصل این ژن از سویه های اشرشیا کلی به کلبسیلا پنومونیه منتقل شده اند (۵۶،۵۷).

#### ۱-۶-۱ روش های تایپینگ کلبسیلا پنومونیه

تایپینگ سویه های کلبسیلا پنومونیه برای بررسی های اپیدمیولوژیکی، انتخاب درمان مناسب، کنترل و پیشگیری عفونت های ناشی از این باکتری دارای اهمیت فراوان می باشد. روش های تایپینگ مطرح شده برای کلبسیلا را می توان به دو دسته روش های فنوتیپی و روش های ژنوتیپی تقسیم بندی نمود (۵۸).

#### ۱-۶-۱ روش های فنوتیپی

در این روش ها از بخش های ساختاری میکرو ارگانیسم برای طبقه بندی آن استفاده می شود. از جمله این روش ها می توان به موارد زیر اشاره نمود:

#### ۱-۱-۶-۱ یو تایپینگ

اساس این روش طبقه بندی باکتری ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک آنها می باشد که در واقع متداولترین روش تایپینگ در آزمایشگاه های کوچک است. ولی با توجه به استفاده زیاد از محیط های کشت و نیاز به مدت زمان طولانی برای حصول پاسخ، بیوتایپینگ روش مناسبی برای بررسی های اپیدمیولوژیک نبوده و باید با سایر روش ها به صورت همزمان مورد استفاده قرار گیرد.

#### ۱-۱-۶-۲ سرو تایپینگ

روش سروتایپینگ یکی از معمول ترین روش هایی می باشد که برای تایپینگ سویه های کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده قرار می گیرد. اساس این روش استفاده از دو ساختار مهم آنتی ژنیک این باکتری ها یعنی لیپولی ساکارید و کپسول پلی ساکاریدی می باشد. لیپولی ساکارید یا آنتی ژن O در ساختار LPS باکتری وجود داشته و بر اساس آن ۹ آنتی ژن O در این باکتری شناسایی شده است. با توجه به اینکه این آنتی ژن توسط کپسول پوشیده شده و در نتیجه آن این آنتی ژن دور از دسترس سیستم ایمنی قرار می گیرد، طبقه بندی بر اساس این آنتی ژن مشکل خواهد بود (۵۹). اکثر ایزوله های کلینیکی کلبسیلا را می توان با تیپ بندی مولکولی شناسایی کرد ولی اشکال این روش هم در این است که امکان واکنش های متقاطع سروولوژیکی بین ۷۷ تیپ کپسولی وجود دارد و با توجه به مشاهده برخی از واکنش های ضعیف در این روش تایپینگ، تفسیر نتایج حاصل از آنها مشکل خواهد بود. از طرفی عدم دسترسی تجاری به همه آنتی سرم های ضد کپسولی باعث شده که این تکنیک اغلب در آزمایشگاه های خاصی انجام شود، ولی می توان با استفاده از ژن های مرتبط به یک

سروتیپ خاص و تکثیر آن با استفاده از تکنیک مولکولی PCR، نوع آنتی ژن کپسولی را در سویه مورد نظر شناسایی کرد (۵۹). مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشان می دهند که می توان از ژن *magA* برای شناسایی آنتی ژن کپسولی K1 استفاده کرد (۶۰، ۶۱).

#### ۳-۱-۶-۱ باکتریوسین تایپینگ

باکتریوسین ها، پروتئین های باکتریوسیدی هستند که توسط برخی از باکتری ها تولید شده که از رشد تعداد دیگری از باکتری ها از همان جنس و یا جنس دیگر جلوگیری می کنند. یک ایزوله باکتریایی می تواند از طریق توانایی اش در مهار یک سویه خاص و یا از لحاظ حساسیت به باکتریوسین هایی که توسط گروهی از سویه های تولید کننده باکتریوسین سنتز می شوند، شناسایی گردد. به علت ناپایداری باکتریوسین ها، تولید آنها در محیط مایع کم بوده و ماندگاری ضعیفی دارند. با این وجود از این روش با انجام اصلاحاتی برای تایپینگ کلبسیلا های محیطی و بالینی استفاده می شود (۶۲، ۶۳).

#### ۴-۱-۶-۱ فازتایپینگ

فازتایپینگ کلبسیلا برای اولین بار در دهه ۱۹۶۰ صورت گرفت. اساس این روش استفاده از فازهای معتدل برای افتراق بین گونه های کلبسیلا می باشد و با وجود اینکه واکنش فاز به راحتی قابل تفسیر بوده و تکرار پذیری آن قابل قبول می باشد ولی قدرت تایپینگ آن بین ۶۷-۱۹٪ متغیر می باشد و باید با سایر روش های تایپینگ استفاده شود که معمولا به عنوان یک روش دوم در ترکیب با تست های سرولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرد (۵۷، ۶۴).

#### ۵-۱-۶-۱ آنتی بیوگرام

این روش تکنیک مناسبی است که می توان از آن برای بررسی حساسیت و مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های باکتریایی استفاده نمود. ولی استفاده آن برای تایپینگ سویه ها، با توجه به اینکه ممکن است الگوهای حساسیت مشابهی در بین سویه ها وجود داشته باشد، دارای محدودیت می باشد. به طور کلی می توان بیان کرد که روش های فنوتیپی قدرت تمایز، تکرار پذیری و تیپ بندی به صورت کامل را ندارند.

#### ۲-۶-۱ روش های مولکولی

اساس این روش ها استفاده از ژنوم میکروارگانیزم ها برای تیپ بندی آنها می باشد. از این روش ها به صورت گسترده برای تایپینگ سویه های کلبسیلا استفاده می شود. این روش ها شامل:

##### ۱-۲-۶-۱ ریو تایپینگ

اساس این روش استفاده از ژن های کد کننده RNA های ریبوزومی می باشد. این ژن ها بسیار حفاظت شده بوده و به تعداد بسیار در طول کروموزوم مشاهده می شوند. بنابراین با استفاده از پروب های مخصوص rRNA هیبرید می شوند.

##### ۲-۲-۶-۱ تعیین الگوی پلاسمیدی

اساس این روش استفاده از پلاسمیدهای باکتریایی است که بر روی ژل آگاروز بر اساس وزن مولکولی شان از یکدیگر جدا می شوند. به این ترتیب سویه های دارای پلاسمیدهای با وزن مولکولی و تعداد مشابه، در یک گروه قرار می گیرند. این روش تایپینگ به علت عدم حضور پلاسمید در برخی از سویه ها و یا از دست دادن پلاسمید بر اثر پاساژهای متوالی در یک سویه دارای محدودیت هایی برای انجام تایپینگ سویه ها می باشد.

##### ۳-۲-۶-۱ RFLP



اساس این روش مولکولی استفاده از آنزیم های اندونوکلاز محدود کننده برای برش ژنوم باکتری و جداسازی قطعات حاصل از برش بر اساس وزن مولکولی شان بر روی ژل آگاروز می باشد.

#### ۱-۶-۲-۴ مالتی لکوس آنزیم الکتروفورز<sup>۱</sup>

اساس این روش هم استفاده از آنزیم های متابولیسمی سلول باکتری و الکتروفورز آنها بر روی ژل و در نتیجه مقایسه تشابه و یا تفاوت سویه ها با یکدیگر بر اساس آن می باشد. زیرا هر ژن کد کننده یک پروتئین است و ارتباط منطقی بین پروتئین ها دال ارتباط بین ژن ها و یا لکوس های ژنی کد کننده آن پروتئین ها می باشد.

#### ۱-۶-۲-۵ الکتروفورز میدان پالسی

در این روش می توان الگوی کامل و محدود شده DNA ژنومیک را مشاهده کرد. این تکنیک بعد از روش Sequencing به عنوان دومین روش استاندارد تایپینگ مطرح شده است. امکان تمایز زیاد این سویه ها، تکرار پذیری خوب و تفسیر آسان برای این روش تایپینگ باعث شده که این روش به طور وسیع برای بررسی های اپیدمیولوژیکی سویه های کلبسیلا مورد استفاده قرار گیرد (۶۵).

#### ۱-۷-۱ آنتی بیوتیک های کوئینولون

##### ۱-۷-۱ مقدمه

کوئینولون ها شامل گروه نسبتاً بزرگ در حال رشد و ازجمله جالب ترین گروه ها در بین داروهای ضد باکتریال هستند که تاثیر بسزایی در زمینه شیمی درمانی ضد باکتریایی به ویژه در سال های اخیر داشته است. علت اهمیت آنها ویژگی هایی است که آنها را به آنتی بیوتیک های ایده آل تبدیل نموده است از جمله اثربخشی بالای آنها، فعالیت وسیع الطیف آنها، دسترسی زیستی بالا و فرمولاسیون خوراکی و تزریقی داخل

---

Multilocus Enzyme Electrophoresis<sup>1</sup>

عروقی، سطوح سرمی بالا، حجم بالای توزیع که نشان دهنده غلظت مشخص در بافت و پایین بودن احتمال بروز عوارض جانبی، در حال حاضر تحقیقات بیشتر سعی دارد به این ویژگی های بالقوه تحقق بخشد (۶۶).

#### ۱-۷-۲ تاریخچه کوئینولون ها

کوئینولون ها رده ای از عوامل ضد میکروبی هستند که از زمان کشف آنها یعنی بیش از ۴۰ سال پیش علاقه ی چشمگیری نسبت به آنها ایجاد شده است. علیرغم برخی از اولین آنتی بیوتیک ها که در قرن گذشته کشف شدند، کوئینولون رده ای از عوامل ضد میکروبی است که از ارگانسیم های زنده گرفته نشده است، بلکه بوسیله شیمیدان ها سنتز شده است (۶۷). با توجه به هسته ی ۴-کوئینولون، کوئینولون ها شامل گروه نسبتاً بزرگ و در حال گسترشی از ترکیبات سنتتیک هستند. یک آلکالوئید با ساختار کوئینولونی توسط Price آماده شد اما هیچ فعالیت بیولوژیکی نشان نداد. در سال ۱۹۶۰، Barto و همکارانش ۶-کلرو-۱-هیدرواتیل، ۴-اوکسو کوئینولون ۳-کربوکسیلیک اسید را طی تحقیقات علیه مالاریا جداسازی نمودند که فعالیت ضد باکتریایی داشت (۶۶). تولید پرولیفیک کوئینولون ها در سال ۱۹۶۲ آغاز شد، هنگامی که Lesher و همکارانش به طور تصادفی نالیدیکسیک اسید را به عنوان محصول جانبی سنتز ترکیب ضد مالاریا (کلروکوئین) کشف نمودند. این اکتشاف منجر به شکل گیری مجموعه ای از ترکیبات کوئینولونی گردید (۶۷). به ویژه با مصرف بالینی کوئینولون ها در زمان حاضر اکتشافات دیگری نیز صورت گرفت اگر چه تنها تعداد معدودی حائز اهمیت بودند چرا که توانسته (۱) درک بهتری از مکانیسم عمل کوئینولون ها فراهم آورند. (۲) قابلیت تغییر هسته کوئینولون ها جهت ارتقاء قدرت اثر و طیف فعالیت ضد میکروبی را ایجاد کنند. (۳) فرصتی فراهم آوردند برای تاخیر در نیمه عمر این ترکیبات و ارتقاء ویژگی فارماکوکنتیک و فارماکودینامیک این ترکیبات که منجر به مؤثر

بودن دوز واحد روزانه می‌شود. ۴) درک روشنی از اهمیت ارتباط ساختار و فعالیت (SARs<sup>۲</sup>) کوئینولون‌ها با توجه به حساسیت‌های آنها به شکل‌گیری مقاومت باکتریایی و قابلیت ایجاد عوارض جانبی در بیماران درمان شده ارائه کند (۶۷). از زمان کشف پیش‌ساز ۱ و ۸ نافتیریدین (نالیدیکسیک اسید)، در سال ۱۹۶۲، تنها استفاده‌ای که می‌شد در درمان عفونت‌های دستگاه‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی بود، کوئینولون‌ها رشد کرده و عوامل مهم و موثری در درمان عفونت‌های باکتریایی شدند. ساختار مولکولی کوئینولون‌ها چندین بار در ارتباط با نیاز بالین اصلاح شده است (۶۸).

باکتری‌ها با یک مشکل توپولوژیکی عمده‌ای مواجه هستند زیرا باکتری دارای یک کروموزوم است که متشکل از DNA دو رشته‌ای است که ۱۳۰۰ میکرومتر طول دارد در حالی که یک باکتری متوسط تنها ۲ میکرومتر طول و ۱ میکرومتر عرض دارد (67).

در سال ۱۹۷۴، مطالعه‌ای توسط Worcel به توصیف چگونگی بسته‌بندی کروموزوم در باکتری اشریشیا کلی پرداخت. Worcel مشاهده کرد که کروموزوم به ۶۵ ناحیه تقسیم شده است که آنها را دومین نامگذاری نمود، هر کدام از این دومین‌ها حدود ۲۰ میکرومتر طول داشت و به یک هسته‌ی RNA متصل بود. اندازه هر دومین با چرخش در جهت منفی کاهش یافته بود به این معنی که چرخش در جهت مخالف جهت طبیعی وضعیت مارپیچ DNA در حالت خطی بود. در سال ۱۹۷۶، Crumplin و اسمیت مشاهده کردند که کوئینولون نالیدیکسیک اسید منجر به تجمع غیر طبیعی پیش‌سازهای DNA تک رشته‌ای شده است، به طوریکه وقتی هر دومین کروموزومی سوپرکویل می‌شود به صورت موقت شکسته می‌شود. علاوه بر این هنگامی که سوپر کویل کامل می‌شود، وضعیت تک رشته‌ای DNA از طریق فعالیت محکم نمودن آنزیمی که به طور اختصاصی توسط کوئینولون مهار می‌شود، از بین می‌رفت. این مشاهدات به توصیف چگونگی مکانیسم عمل کوئینولون‌ها

بر علیه باکتری کمک قابل توجهی نمود. متعاقبا Gelert و همکارانش این آنزیم را که DNA دو رشته ای را برش می داد و سوپرکویل منفی ایجاد می کرد و پس از آن DNA برش یافته را بهم متصل می کرد، شناسایی نموده و آن را DNA ژیراز (یا توپوایزومراز II) نامگذاری کردند. این مشاهدات اساس مولکولی اثرات ضد میکروبی کوئینولون های جدید را توصیف نمود. به دنبال آن چهار آنزیم DNA توپوایزومراز باکتریایی شناسایی شدند. توپوایزومراز I و III حساسیت زیادی به مهار توسط کوئینولون ها ندارند، در حالیکه توپوایزومراز II و IV دو هدف اصلی کوئینولون ها هستند. هر دو توپوایزومراز II و IV ساختارهای تترامری هستند که از دو جفت زیر واحد تشکیل شده اند. چهار زیر واحد توپوایزومراز II عبارتند از: ۲ مونومر A و ۲ مونومر B که به ترتیب با عناوین GyrA و GyrB اشاره به DNA ژیراز، شناخته می شوند. توپوایزومراز IV نیز زیر واحدهای A و B دارد که بوسیله ژن های *parC* و *parE* کد می شوند. توپوایزومراز IV در جدا کردن مولکول های DNA متصل در سلول های باکتریایی نقش دارد. بنابراین توپوایزومراز II و IV هدف های کشنده کوئینولون ها می باشند. شناسایی آنها منجر به ایجاد کوئینولون های جدیدی شد که فعالیت ارتقاء یافته ای در مقابل توپوایزومراز II و IV دارند (۶۷).

### ۱-۷-۳ ساختار و فعالیت

تغییراتی در هسته کوئینولون: کوئینولون ها از کوئینین<sup>۳</sup> مشتق شده اند. شکل ۲ اساس مولکول فلوروکوئینولون یا فارماکور را نشان می دهد. اضافه شدن یک مولکول فلورین در موقعیت ۶ یکی از ابتدائی ترین تغییرات در ساختار کوئینولون بود. این تغییر تنها بیش از ۱۰ برابر خاصیت ممانعت کنندگی ژیراز و ۱۰۰ برابر MIC را بهبود می بخشد. از ساختار پایه، ۲ گروه اصلی ایجاد می شوند: کوئینولون ها و نافتیریدون ها، وجود یک

---

<sup>3</sup> quinine

نیتروژن در موقعیت ۸ مشخصه نفتیریدون ها و یک کربن و گروه وابسته در موقعیت ۸ کوئینولون ها را مشخص می کند (۶۹). یک یافته کلیدی جدید در تکامل کوئینولون ها تغییر هسته کوئینولون از طریق افزودن جانشین های جدید در موقعیت های N-1، C5، C-6، C-7 و C-8 بود (۶۶، ۶۷، ۶۹). این تغییرات، فعالیت ضد میکروبی، ویژگی فارماکوکینتیکی و فارماکودینامیکی کوئینولون ها را تغییر داده و درک بهتری از SARs در ترکیبات کوئینولون فراهم می آورد. اضافه شدن جانشین های انتخاب شده ی اختصاصی در این موقعیت های کلیدی در هسته کوئینولون می تواند امکان هدف گیری گروه های خاصی از باکتریها را ایجاد کند و ویژگی های فارماکوکینتیک ترکیبات اولیه کوئینولون را ارتقاء دهد. برخی از تغییرات کلیدی شامل اضافه شدن اتم فلورین در موقعیت C-6 فعالیت مهاري DNA ژيراز را افزايش داده، نفوذ به سلول باکتریایی را تسهیل می نماید و فعالیت ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس فراهم می آورد. افزایش گروه فلورین دوم در ناحیه C-8 منجر به افزایش جذب و نیمه عمر طولانی تر می گردد، اما سمیت نوری را افزایش می دهد (۶۷). افزودن یک گروه پیرازین در موقعیت C-7 (برای مثال نورفلوکساسین<sup>۴</sup>) بیشترین فعالیت را علیه باکتری گرم منفی هوازی فراهم می آورد و فعالیت علیه گونه های استافیلوکوکوس و پseudomonas را افزایش می دهد. اطلاعاتی مبنی بر اینکه حلقه پیرازین مانع از مکانیسم پمپ افلاکس می شود وجود داشته که این خود توانایی این دارو را افزایش می دهد (۶۷، ۶۹). وجود گروه پایرولودینیل در موقعیت C-7 (برای مثال کیلینافلوکساسین<sup>۵</sup>) فعالیت ضد میکروارگانیزم های گرم مثبت را افزایش می دهد (۶۹). آلکیلاسیون حلقه C-7، فعالیت علیه باکتری گرم مثبت هوازی را افزایش می دهد و نیمه عمر ترکیبات کوئینولون را افزایش می دهد. افزودن یک گروه متیل به نیتروژن دیستال حلقه پیرازین C-7 نیز نیمه عمر را افزایش داده و دسترسی زیستی این ترکیبات را نیز افزایش

می‌دهد. در نهایت از افزودن گروه سیکلوپروپیل در موقعیت N-1 سیپروفلوکساسین<sup>۶</sup> بدست می‌آید که فعالیت ضد باکتریایی بیشتری علیه پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفی دارد (۶۷). این تغییر باعث افزایش قدرت دارو شد و به همین منظور بسیاری از کوئینولون های بعدی گروه سیکلوپروپیل را به همراه داشتند (برای مثال گراپافلوکساسین<sup>۷</sup>، موکسی فلوکساسین<sup>۸</sup>، گتی فلوکساسین<sup>۹</sup> و گارنوکساسین<sup>۱۰</sup>). همچنین اضافه کردن یک گروه ۲،۴ دیفلورو فنیل در موقعیت ۱ (برای مثال تروافلوکساسین<sup>۱۱</sup>) توان دارو مخصوصا فعالیت ضد بی هوازی آن را بهبود می بخشد. تعدادی دیگر از دستکاری های ساختار برای بهبود بخشیدن به فعالیت ضد گرم مثبت فلورو کوئینولون ها انجام شده است. یکی از اولین ترکیبات، یک گروه NH2 در موقعیت C-7 به آن اضافه شده بود که نتیجه آن افزایش فعالیت ضد گرم مثبت ها بود. این موضوع در مورد پارفلوکساسین<sup>۱۲</sup> که ساختار خیلی مشابهی به سیپروفلوکساسین دارد، دیده شده است. همچنین پارفلوکساسین یک فلورین در موقعیت C-6، یک پیرازین در موقعیت C-7 داشته و آلکیل شده است. گراپافلوکساسین نیز یک جانشینی بوسیله یک گروه CH3 در C-5 دارد و توانایی ضد گرم مثبت آن در مقایسه با سیپروفلوکساسین بهبود پیدا کرده است. جانشینی در موقعیت C7 با تعدادی از خواص کلیدی مانند طیف آنتی باکتریال، دسترسی بیولوژیکی و عوارض جانبی در ارتباط می باشد. معمولترین جانشینی مربوط به گروه های آمینوی حلقوی می باشد. برای مثال پیرازین یا حلقه های پیرولیدین، اما دیگر گروه ها موفقیت کمتری در جانشینی دارند. حلقه های پیرازین به طور ویژه ای معمول هستند برای مثال نورفلوکساسین، انوکساسین<sup>۱۳</sup> یا سیپروفلوکساسین و توانایی مقابله با باکتری گرم منفی

---

Ciprofloxacin<sup>6</sup>  
 Grepafloxacin<sup>7</sup>  
 Moxifloxacin<sup>8</sup>  
 Gatifloxacin<sup>9</sup>  
 Garenoxacin<sup>10</sup>  
 Trovafloxacin<sup>11</sup>  
 Sparfloxacin<sup>12</sup>  
 Enoxacin<sup>13</sup>

را اعطا می کنند. علاوه بر این گروه های متیل می تواند هم جذب خوراکی و هم فعالیت دارو در *in vivo* (در داخل بدن) را بهبود ببخشند. با این حال، فعالیت بهبود یافته بر علیه باکتری های گرم مثبت گاهی می تواند در فعالیت بر علیه پseudomonas آئروژینوزا به کار گرفته شود. حلقه های پیرولیدین (پنج ضلعی) نیز جانشین های معمول در موقعیت ۷ هستند و با افزایش توانایی بر علیه باکتری های گرم مثبت در ارتباط می باشند. با این حال این گروه با کاهش حلالیت در آب، کاهش جذب خوراکی در ارتباط است و در نتیجه فعالیت *in vivo* ممکن است در خطر بیفتد و باقرار گرفتن یک گروه متیل بر روی حلقه پیرولیدین می توان به بعضی از این ویژگی های فیزیکی غلبه کرد. ژمی فلوکساسین<sup>۱۴</sup>، یک نافتریدیون، مثال خوبی از مزیت و معایب مرتبط با موقعیت ۷ حلقه پیرولیدین می باشد. علاوه بر این گروه های آزا بی سیکلو بر روی موقعیت ۷ در عواملی چون موکسی فلوکساسین و تروافلوکساسین منتج به فعالیت ضدگرم مثبت قابل توجه، لیپوفیلیسیته مشخص و نیمه عمر بالای ۱۰ ساعت می شود (۶۹).

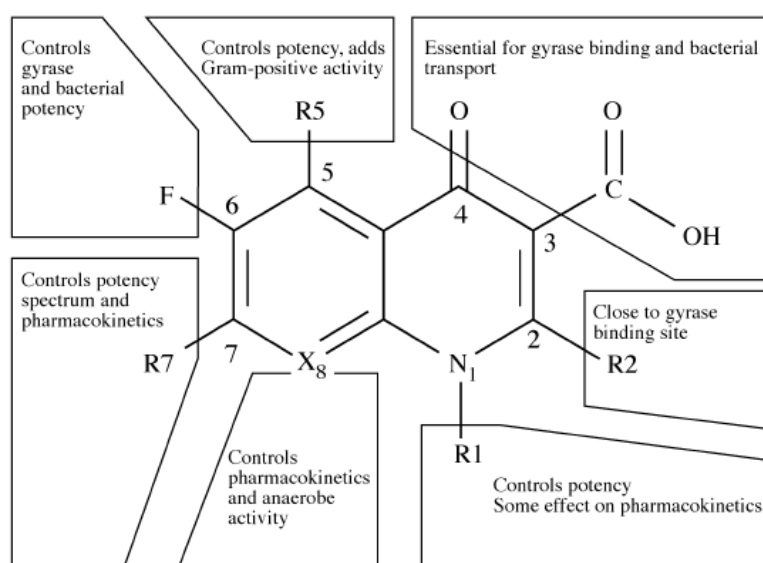
همچنین دستکاری گروه در موقعیت ۸ در تغییر فارماکوکینتیکی خوراکی، وسیع شدن طیف فعالیت و کاهش در انتخاب موتانت ها نقش دارد. در حالیکه در آلکیلاسیون افزایش زیاد فعالیت ضد گرم مثبت و همچنین بهبود نفوذ در بافت و افزایش نیمه عمر آن با افزایش لیپوفیلیسیته نشان داده شده است همانطوری که در گریپافلوکساسین، لووفلوکساسین<sup>۱۵</sup> و پارفلوکساسین وجود دارد (۶۹).

به علاوه افزایش فعالیت علیه گونه های مایکوپلاسما و کلامیدیا از طریق افزودن یک گروه آمینو در C-5 و یک گروه فلورین در C-8 به ترکیبات کوئینولون که دارای یک گروه سیکلوپروپیل در N-1 هستند، قابل دستیابی است. به طور مشابهی ارتقاء کلی فعالیت ضد باکتریایی به سادگی از طریق افزودن یک فلورین یا

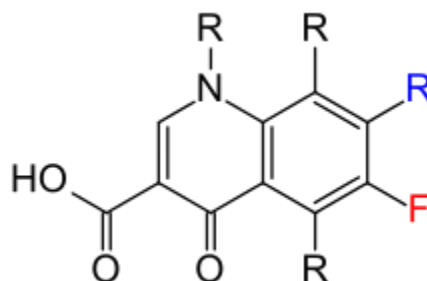
---

Gemifloxacin<sup>14</sup>  
Levofloxacin<sup>15</sup>

کلرین به C-8 این ترکیبات که دارای یک گروه سیکلوپروپیل در N-1 هستند امکان پذیر است. جدیدترین تغییر کلیدی مشاهده شده افزایش گروه متوکسی به جای هالید در موقعیت C-8 بود که به طور اختصاصی باعث هدف گیری هر دو توپوایرومراز II و IV می شود که در کاهش احتمال ایجاد مقاومت نسبت به کوئینولون ها مؤثر است. از بین عوامل ضد باکتریایی که در حال حاضر در دسترس هستند تنها گتی فلوکساسین و موکسی فلوکساسین یک گروه C-8 متوکسی در ساختار شیمیایی خود دارند (۶۷).



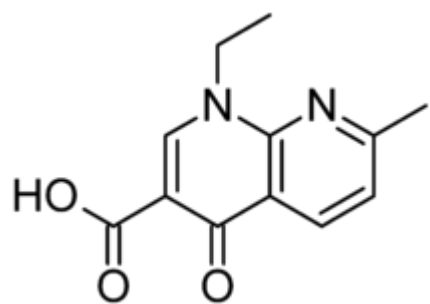
شکل ۲: ساختار پایه و شاخه های جانبی مولکول کوئینولون و نافتیریدون



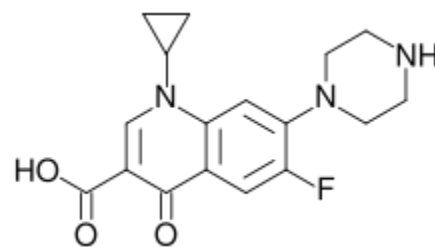
شکل ۳: ساختار اصلی بیوتیک های کوئینولون که در جایگاه R معمولا حلقه پیرازین قرار می گیرد و در جایگاه F معمولا فلورین قرار

می گیرد

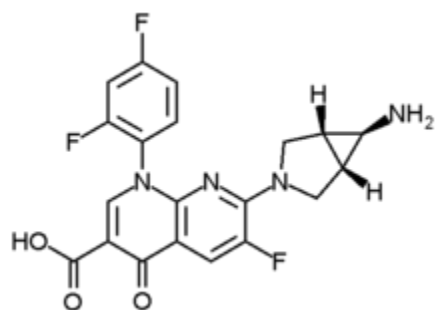




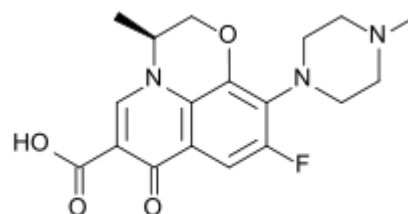
Nalidixic acid



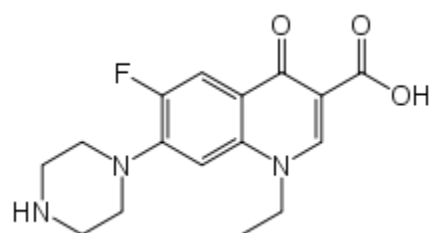
Ciprofloxacin



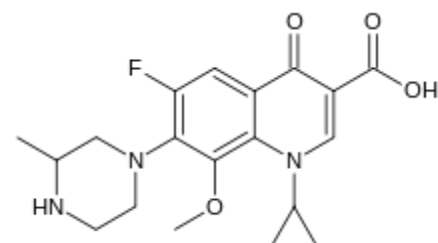
Trovafloxacin



Levofloxacin



Norfloxacin



Gatifloxacin

شکل ۴: ساختار چند آنتی بیوتیک

کوئینولون ها انالوگ های سنتتیک نالیدیکسیک اسید هستند که کوئینولون های در دسترس شامل (۷۰):

### First generation

Nalidixic acid, Cinoxacin, Oxolinic acid

### Second generation

Ciprofloxacin, Enoxacin, Fleroxacin, Lomefloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Pefloxacin, Rufloxacin

### Third and fourth generation

Besifloxacin, Clinafloxacin, Garenoxacin ,Gatifloxacin ,Gemifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Sitafoxacin,Sparfloxacin

۱-۷-۵ طبقه بندی بر مبنای عملکرد:

تفاوت های موجود در فعالیت In vitro فلوروکوئینولون ها در درجه اول اساس طبقه بندی آنها را تشکیل می دهد:

کوئینولون های نسل اول قدیمی از جمله نالیدیکسیک اسید<sup>۱۶</sup>، اگزولینیک اسید<sup>۱۷</sup>، سینوکساسین<sup>۱۸</sup>، پایرومیدیک اسید<sup>۱۹</sup>، پایپمیدیک اسید<sup>۲۰</sup>، فلومکوئین<sup>۲۱</sup> علیه باکتریهای گرم منفی هوازی فعالیت خیلی خوبی داشتند، از طرفی کوئینولون های نسل اول بر علیه باکتری های گرم مثبت هوازی و باکتری های بی هوازی فعالیت چندانی نداشتند

---

Nalidixic acid<sup>16</sup>  
Oxolinic acid<sup>17</sup>  
Cinoxacin<sup>18</sup>  
Piromidic acid<sup>19</sup>  
Pipemidic acid<sup>20</sup>  
Flumequine<sup>21</sup>

(۶۷). فلومکوئین اولین فلوروکوئینولونی بود که تا قبل از گزارش سمیت چشمی به مدت کمی مورد استفاده بود.

(۶۸).

در سال ۱۹۸۰ کوئینولون های نسل دوم معرفی شدند هنگامی که نورفلوکساسین از طریق افزودن یک فلورین به C-6 و یک پیرازین دی آمین حلقوی در C-7 به وجود آمد. این تغییرات فعالیت آنتی میکروبی علیه باکتریهای هوازی گرم مثبت و گرم منفی را در مقایسه با کوئینولون های نسل اول ارتقاء داد، اما کوئینولون های نسل دوم نیز فاقد فعالیت مؤثر علیه باکتریهای بیهوازی بودند. نورفلوکساسین اولین فلوروکوئینولونی بود که نام آن نشان دهنده‌ی افزودن یک فلورین در موقعیت C-6 است (۶۷).

سایر کوئینولون های نسل دوم شامل سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین<sup>۲۲</sup>، لووفلوکساسین، انوکساسین، فلوروکساسین، لومفلوکساسین<sup>۲۳</sup>، پفلوکساسین<sup>۲۴</sup>، روفلوکساسین<sup>۲۵</sup> می‌باشند (۶۷). با ظهور سیپروفلوکساسین، تقریباً برای اولین بار عفونت های گرم منفی جدی مستعد باکتری می نظیر پیلونفریت، پروستاتیت و استئومیلیت با کارایی بالا در بیماران سرپایی با تجویز آنتی بیوتیک های خوراکی درمان شد، به طور مشابهی عفونت های تنفسی پسودوموناس آئروژینوزا در کودکان مبتلا به سیستمیک فیبروز به طور خوراکی قابل درمان شد. تب انتریک (روده ای) و سالمونلوزیس با درمان خوراکی کوتاه مدت با عود ناچیز و میزان انتقال اندک قابل درمان شد (۶۸). تعدادی از کوئینولون های فعال تر مانند سیپروفلوکساسین و اوفلوکساسین فعالیت علیه کلامیدیا (Oriol 1989) و مایکوباکتریوم (گارسیا رودریگز و گومز گارسیا ۱۹۹۳) را نشان می دهند، اما این مساله همیشه بعنوان موفقیت در درمان تلقی نمی شود (Oriol 1989, Young 1993). فعالیت تحت تاثیر pH و

---

Ofloxacin<sup>22</sup>  
Lomefloxacin<sup>23</sup>  
Pefloxacin<sup>24</sup>  
Rufloxacin<sup>25</sup>

در حضور مگنزیوم و سایر کاتیون ها متغیر است ( فعالیت در pH اسیدی معمولا کاهش می یابد) (Smith & Levin 1988) (۴۰).

فلوروکوئینولون های جدیدتر از جمله فلوروکوئینولون های نسل سوم شامل گریپافلوکساسین، گتی فلوکساسین، پارفلوکساسین، تمافلوکساسین<sup>۲۶</sup>، توسوفلوکساسین<sup>۲۷</sup> و پازوفلوکساسین<sup>۲۸</sup> پس از آن تولید شدند و اثر بیشتری علیه باکتریهای گرم مثبت به ویژه پنوموکوک ها دارند. آنها همچنین فعالیت خوبی علیه باکتریهای بیهوازی دارند (۶۷). پارفلوکساسین امروزه به خاطر سمیت نوری قابل توجه و تپش نامنظم قلبی شدید و ثانیا به خاطر اثر روی فاصله QT کنار گذاشته شده است (۶۸).

گروه آخر ترکیبات نظیر تروافلوکساسین، کیلینافلوکساسین، سیتافلوکساسین، موکسی فلوکساسین و ژمی فلوکساسین، نسل چهارم فلوروکوئینولون ها نامیده شده اند، زیرا فعالیت مؤثر علیه بی هوازی ها و فعالیت بیشتری علیه پنوموکوک دارند (۶۷). موکسی فلوکساسین و تروافلوکساسین هر دو ترکیبات ۷-آزابی سیلکو دارند، همگی این ترکیبات در مقابل استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به پنی سیلین فعال هستند و کارایی بالایی در درمان عفونت های مجاری تنفسی تحتانی نشان داده اند. تروافلوکساسین که فعالیت بسیار خوبی علیه بی هوازی ها داشته قبل از تعلیق، کارایی بالایی در عفونت های داخل شکمی پس از جراحی و عفونت های بانوان نشان داده بود (۶۸). ژمی فلوکساسین در مقایسه با اجدادش فعالیت بسیار بیشتری علیه استرپتوکوکوس پنومونیه دارد. ساختار زنجیره ی جانبی آن شامل گروه ۱-سیکلوپروپانیل است که شاخصه ی اکثر فلوروکوئینولون های با مشخصات ایمنی مناسب از جمله سیپروفلوکساسین است، برخلاف استخلاف ۱-دی فلورو فیل تمافلوکساسین و تروا فلوکساسین. به علاوه ژمی فلوکساسین یک زنجیره جانبی بزرگ در موقعیت ۷

---

Temafloxacin<sup>26</sup>  
Tosufloxacin<sup>27</sup>  
Pazufloxacin<sup>28</sup>

دارد، که تصور می شود با عواض کمتر در CNS مرتبط باشد و یک گروه متوکسی آمینو که احتمالا باعث پیشرفت ناگهانی در فعالیت ضد پنوموکوکی مشاهده شده در این ترکیب می باشد. ژمی فلوکسازین همچنین فعالیت علیه سویه های مقاوم به پنی سیلین و سویه ها مقاوم به سیپروفلوکسازین استرپتوکوکوس پنومونیه را حفظ نموده است. فعالیت آن علیه استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به کوئینولون ممکن است در رابطه با افزایش مشکل مقاومت به پنی سیلین، ماکرولیدها و فلوروکوئینولون های قبلی حائز اهمیت باشد. ژمی فلوکسازین همچنین فعالیت زیادی علیه پاتوژن های غیر معمول مجاری تنفسی که از نظر بالینی حائز اهمیت اند نظیر کلامیدیا پنومونیه، لژیونلا پنوموفیلا و مایکوپلاسما پنومونیه دارد. ایمنی ژمی فلوکسازین در برنامه های کارآزمایی بالینی مورد مطالعه قرار گرفته است، داده های اولیه نشان می دهد که این ترکیب پروفایل واکنشی دارویی رضایت بخشی دارد. ژمی فلوکسازین در دوزهای واحد کمتر یا مساوی ۸۰۰ میلی گرم و در دوزهای چند گانه در داوطلبان سالم کمتر یا مساوی ۶۴۰ میلی گرم در روز و بیماران کهنسال ۳۲۰ میلی گرم در روز به کار گرفته شد و تحمل خوبی نسبت به آن مشاهده شد (۶۸).

اگر چه روش های متعددی برای گروه بندی کوئینولون ها وجود دارد از جمله ساختارهای شیمیایی، ارتباط فعالیت و ساختار، یا بر اساس طیف فعالیت ضد میکروبی در *In vitro* یا اثربخشی بالینی، که این طبقه بندی ها به وضوح اختیاری هستند. سیستم طبقه بندی ذکر شده در بالا، نسل ۱ تا ۴ بر اساس جدیدترین طیف فعالیت ضد میکروبی و اثر بخشی علیه پنوموکوک و ارگانیسم های بی هوازی است و یک طبقه بندی کاربردی برای استفاده در بالین را فراهم آورده است (۶۷).

تاثیر بر ویژگی های فارماکوکینتیک: تغییرات ساختاری کلیدی منجر به ارتقاء ویژگی فارماکوکینتیک از جمله نیمه عمر بالاتر، که امکان یک دوز واحد روزانه را فراهم می کند و جذب بافتی بیشتر در برخی از کوئینولون ها

از جمله گریپافلوکساسین، گتی فلوکساسین، پارفلوکساسین، تروافلوکساسین، کیلینافلوکساسین، سیتافلوکساسین، موکسی فلوکساسین می‌گردد. تغییرات اختصاصی شامل الکیلاسیون کوئینولون‌ها که نیمه عمر کوئینولون‌ها و جذب بافتی را ارتقاء می‌دهد. اضافه شدن دو گروه متیل به C-7 حلقه پیرازین که کارایی آن در حالت خوراکی را افزایش می‌دهد، افزودن یک گروه آمینو در C-5 که چربی دوستی آن را ارتقاء می‌دهد و افزودن هالوژن در موقعیت C-8 که فعالیت *In vivo* را افزایش می‌دهد (۶۷).

### ۱-۷-۶ عوارض جانبی

بروز عوارض ناخواسته متعاقب کوئینولون‌های نسل یک محدود بود، این عوارض معمولاً در چند روز اول درمان ظهور یافته و با فراوانی بین افراد جوان و سالمند مشاهده می‌شد به استثناء اینکه این عوارض جانبی مرتبط با CNS در افراد سالمند بیشتر دیده می‌شد. میزان عوارض مرتبط با فلوروکوئینولون‌های خوراکی و تزریقی و در ارتباط با دوز آنها بوده است، چنانچه افزایش دوز و مدت زمان مصرف دارو همراه با عوارض بیشتر بوده است. در هر عارضه فلورو کوئینولون‌ها در مقایسه با سایر رده‌های ضد میکروبی نسبتاً ایمن در نظر گرفته می‌شوند. اختلالات گوارش (معدی-روده‌ای) با فراوانی بیشتری گزارش شده است و پس از آن عوارض CNS، واکنش ازدیاد حساسیت، ندرتا کاهش فشار، افزایش ضربان قلب، پیدایش بلور در ادرار، کاهش ترومبوسیت در خون، لکوپنی و آنمی قرار دارند (۶۷).

برخی از کوئینولون‌های اولیه با تتوفیلین و کافئین و سایر ترکیبات کوئینولونی (آنهايي که دارای فلورین در C-8 هستند) واکنش دادند و سمیت نوری متوسط تا شدید به دنبال داشتند زیرا با غلظت‌های بالا در پوست تجمع می‌یابند. سمیت نوری در مصرف لومفلوکساسین، فلوروکساسین، پارفلوکساسین شایع تر و شدیدتر است. در موارد مصرف گریپافلوکساسین، اوفلوکساسین، سپیروفلوکساسین، لووفلوکساسین، تروافلوکساسین، به ترتیب

نادرتر و کمتر می‌شود. واکنش سمیت نوری متعاقب مصرف موکسی فلوکسازین و گتی فلوکسازین گزارش شده است. خوشبختانه سمیت نوری در مورد فلوروکوئینولون‌هایی که در حال حاضر کاربرد متداولی دارند گزارش نشده است. سه عارضه مشاهده شده در اثر کوئینولون‌ها: -سمیت قلبی- کاردیوتوکسیسیته (نظیر طولانی شدن وقفه QT اصلاح نشده)، سمیت کبدی و کاهش قند- اینها بیشتر از سایر عوارض مورد توجه هستند. کوئینولون‌های نافتیریدون نظیر نالیدیکسیک اسید، پیرومیدیک اسید، پایمیدیک اسید، انوکسازین، توسوفلوکسازین، تراوافلوکسازین و ژمی فلوکسازین در هسته پایه خود دو نیتروژن دارند که یک نیتروژن در موقعیت ۱ و نیتروژن دیگر در موقعیت ۸ قرار دارند. برخی از کوئینولون‌های نافتیریدون عوارض جدی بیشتری را در مقایسه با کوئینولون‌های بدون نیتروژن در موقعیت ۸ نشان می‌دهند (۶۷). واکنش نوری احتمالا بیشترین تاثیر را بوسیله موقعیت ۸ با فلورین یا کلرین داشته که بیشترین پتانسیل فوتوتوکسیسیته را دارند برای مثال لومفلوکسازین، کلینافلوکسازین، Bay y3118 و پارفلوکسازین و کمترین تاثیر را با گروه‌های متوکسی دارد برای مثال موکسی فلوکسازین یا گتی فلوکسازین (۶۹). همچنین حدس‌های زیادی حول احتمال وابستگی ساختاری در سندروم شبه یورومیک خونریزی دهنده توسط تمافلوکسازین، ائوزینوفیلی کبدی توسط تراوافلوکسازین، ائوزینوفیلی میان بافتی ریوی و عوارض جانبی ایمونولوژیکی دیگر توسط توسوفلوکسازین و ژمی فلوکسازین و هیپوگلیسمی که در تمافلوکسازین و کلینافلوکسازین دیده شده‌اند وجود دارد. با این که تعدادی از این عوامل نافتیریدون هستند (تراوافلوکسازین، تسوفلوکسازین و ژمی فلوکسازین) بقیه فلوروکوئینولون می‌باشند (تمافلوکسازین)، از این جهت که آیا این تفاوت‌ها با هم ارتباط داشته باشند نا مشخص است. یک ارتباط قوی، وجود گروه ۲ و ۴ دی فلوروفیل در موقعیت ۱ است که در تراوافلوکسازین، تمافلوکسازین و توسوفلوکسازین مشترک است ولی در ژمی فلوکسازین وجود ندارد. فرضیه

دیگر مبنی بر این که متابولیت های این عوامل (که هنوز به طور کامل شناخته نشده اند) که از لحاظ ساختاری مشابه هستند ممکن است عامل وقایع مضر ایمنولوژیکی باشند که در این داروها دیده شده است (۶۹). مشاهده شده که فلوروکینولون ها می توانند باعث آرتروپاتی در حیوانات جوان مورد آزمایش شوند بنابر این این داروها به بچه ها در سنین پایین و خانم ها در سنین باروری توصیه نمی شود. مواردی از التهاب تاندون آشیل گاهی همراه با پارگی تاندون گزارش شده است (Ribard et al 1992). (۴۰)

#### ۷-۷-۱ مکانیسم عمل آنتی بیوتیک های کوئینولون

اهداف عمل کوئینولون آنزیم های اصلی باکتریایی DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ است. هر دو آنزیم کمپلکس بزرگی متشکل از دو جفت زیر واحد هستند. زیر واحدهای DNA ژیراز، GyrA یک پروتئین ۹۷ کیلو دالتونی کد شده توسط ژن *gyrA* و GyrB یک پروتئین ۹۰ کیلو دالتونی کد شده توسط ژن *gyrB* می باشند. زیر واحد های مربوط به توپوایزومراز ۴، ParC یک پروتئین ۷۵ کیلو دالتونی کد شده توسط ژن *parC* و ParE یک پروتئین ۷۰ کیلو دالتونی کد شده توسط ژن *parE* هستند. DNA ژیراز می تواند سوپرکویل های منفی را به درون DNA وارد کند، هر دو سوپرکویل منفی و مثبت را بردارد، مولکول های حلقوی بسته را باز کند و دوباره متصل کند. توپوایزومراز ۴ نیز می تواند سوپر کویل های منفی و مثبت را بردارد و در باز کردن رشته حتی بهتر از DNA ژیراز است. دو آنزیم در نسخه برداری، همانند سازی، نوترکیبی و ترمیم DNA با هم فعالیت دارند. آنزیم ها بطور موقت هر دو رشته DNA دو رشته ای را می شکنند و در یک واکنش وابسته به ATP، یک DNA دابل هلیکس ثانویه را از شکاف عبور می دهند که دوباره متصل می شود. کوئینولون ها این واکنش را بلوکه می کنند و DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ را در یک کمپلکس DNA-آنزیم-دارو به دام می اندازند. تعداد کمی از باکتری ها فقط با DNA ژیراز قادر به فعالیت



هستند، اما بیشتر باکتری ها هر دو آنزیم را دارند. در باکتری های گرم منفی DNA ژیراز نسبت به توپوایزومراز-۴ به مهارتوسط کوئینولون ها حساس تر است، در صورتی که در باکتری های گرم مثبت توپوایزومراز-۴ معمولاً هدف اولیه است و ژیراز حساسیت کمتری دارد (۷۱).

### ۸-۷-۱ مقاومت های آنتی بیوتیکی

بسیاری از میکروب های مقاوم که در حال حاضر درمان آنها دشوار است از نظر منشا ژنتیکی قابلیت انتقال بین گونه ای و جنس های باکتریایی را دارند (۷۲). استفاده نامناسب از عوامل ضد میکروبی درمان را با شکست مواجه کرده و سبب ظهور مقاومت های دارویی می گردد. عدم دسترسی، دوز ناکافی، اتصال ضعیف و عوامل ضد میکروبی غیر استاندارد ممکن است نقش مهمی در بروز مقاومت دارویی داشته باشند. همزمان با استفاده گسترده از عوامل ضد میکروبی شیوع مقاومت نسبت به هر یک از داروهای ضد میکروبی جدید افزایش یافته است. شیوع مقاومت دارویی در مناطق جغرافیایی و در زمان های مختلف، متفاوت است. در طی ۱۰ سال گذشته، مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های گرم مثبت مورد توجه زیادی قرار گرفته بود بویژه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکهای مقاوم به ونکومايسين (۷۳). در سال های اخیر یک تغییر عمده بالینی در میکروب شناسی بوجود آمده و آن این است که به طور فزاینده ای باکتری های گرم منفی مقاوم به چندین دارو به عنوان بزرگترین خطر برای بهداشت عمومی مطرح شده اند. به ویژه که همزمان با افزایش مقاومت در باکتری های گرم منفی، توسعه عوامل ضد میکروبی جدید برای مقابله با این باکتری ها اندک می باشد. علی رغم توسعه عوامل ضد باکتریال و تائید عوامل جدید مشکل مقاومت آنتی بیوتیکی در سطح جهان و مرگ و میر بیماران ناشی از بیماری های عفونی همچنان باقی مانده است (۷۴، ۷۵). نظارت بر عوامل ضد میکروبی بدین دلیل قابل اهمیت است که استفاده نامناسب و بیش از اندازه از آنتی بیوتیک ها سبب

تکامل مقاومت های دارویی گشته که خود منجر به افزایش مرگ و میر و عوارض آن شامل افزایش هزینه های مراقبتهای بهداشتی و طولانی شدن مدت زمان بستری بیمار می شود (۷۶).

#### ۱-۸-۷-۱ مقاومت به کوئینولون ها

مقاومت به کوئینولون ها حتی از زمانی که نالیدیکسیک اسید در بیش از ۴۰ سال پیش وارد پزشکی بالینی شد، به عنوان یک مشکل مطرح بود. برای یک مدتی قدرت بیشتر فلوروکوئینولون ها در مقایسه با کوئینولون های قدیمی تر باعث رضایت از مصرف آنها شد، اما نتایج درمانی موفق آنها باعث افزایش استفاده از آنها شد که در عوض منجر به افزایش میزان مقاومت شد. در دهه ۱۹۹۰ استفاده از فلوروکوئینولون ها در ایالات متحده تقریباً ۴۰ درصد افزایش یافت که دو برابر شدن میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در بین باسیل های گرم منفی جدا شده از بیماران ICU را در پی داشت. در ایالات متحده بیش از ده درصد از باکتری های روده ای مثل انتروباکتر کلوآکه، مورگانلا مورگانی، پروتئوس میرابیلیس و سراشیا مارسسنس به سیپروفلوکساسین مقاوم شدند. میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین در پسودوموناس آئروژینوزا و پاتوژن های گرم منفی غیر روده ای بالاتر بود. یک ارتباط قابل توجهی بین مقاومت به کوئینولون ها و اگزاسیلین در میان استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت به ونکومايسين در میان گونه های انتروکوکوس و تولید *ESBL* در کلبسیلا پنومونیه وجود داشت. حتی میزان بالاتری از مقاومت از سایر نقاط دنیا گزارش شده است. برای مثال در طی سال های ۱۹۹۷-۱۹۹۹ تقریباً ۶۰ درصد از سویه های اشرشیا کلی جدا شده از عفونت های بیمارستانی در بیجینگ به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. اگر چه پاتوژن های تنفسی مانند موراکسلا کاتارالیس، هموفیلوس انفلانزا و استرپتوکوکوس پنومونیه عموماً به کوئینولون ها حساس هستند، مقاومت در آنها در یک شیوع محلی گزارش

شده است. مقاومت به فلوروکوئینولون ها در درمان گنوره آ و درمان عفونت های روده ای ناشی از سالمونلا، شیگلا و گونه های کمپیلوباکتر مشکل ایجاد کرده است (۷۱).

#### ۱-۷-۸-۲ مکانیسم های مقاومت به کوئینولون

مقاومت به عوامل ضد میکروبی یک پدیده بیولوژیکی طبیعی می باشد. به دنبال معرفی هر عامل ضد میکروبی برای درمان، ظهور مقاومت به این عوامل ضد میکروبی در آزمایشگاه نیز ایجاد می شود و میکروارگانیسم ها نسبت به آن مقاوم می گردند. مقاومت دارویی ممکن است در ارتباط با یک گونه خاص و یا درون یک جنس که به طور نرمال نسبت به یک عامل ضد میکروبی حساس بوده اند، بدنبال موتاسیون یا انتقال ژن های مقاومت بروز کند. ژن های مقاومت از مسیر های گوناگون و مکانیسم های متنوع به میکروارگانیسم اجازه بروز مقاومت نسبت به اثر مهارکنندگی یک ترکیب آنتی باکتریال را می دهند.

مکانیزم های عمده مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های کینولونی شامل موارد زیر می باشد:

#### ۱-۷-۸-۲-۱ موتاسیونی که اهداف دارو را تغییر می دهد:

موتاسیون های مقاومت در باکتری های گرم منفی ابتدا در ژن *gyrA* رخ می دهد، اما در باکتری های گرم مثبت ابتدا در ژن *parC* رخ می دهد. مقاومت شامل جانشینی اسید آمینه در یک ناحیه ای از زیر واحد GyrA یا ParC می باشد که "ناحیه مشخص کننده مقاومت کوئینولونی" نامیده شده است (QRDR)<sup>۲۹</sup>. این ناحیه در سطح اتصال DNA به آنزیم قرار دارد و برای DNA ژیراز اشرشیا کلی، آمینو اسیدهای بین موقعیت ۵۱-۱۰۶ را شامل می شود، با نقاط خاصی برای موتاسیون در موقعیت آمینو اسید ۸۳ و ۸۷ QRDR در DNA ژیراز نزدیک تیروزین ۱۲۲ است که در آغاز واکنش شکستن رشته با پیوند کوالان به گروه فسفات

روی DNA متصل می شود. بر عکس، در استافیلوکوکوس اورئوس یا استرپتوکوکوس پنومونیه موتاسیون اولیه اغلب در ژن *parC* اتفاق می افتد، در صورتی که در سویه هایی با مقاومت بالا، موتاسیون های اضافی در ژن *gyrA* و *parE* یافت می شود. ابتدا یک موتاسیون اولیه در DNA ژیراز، حساسیت ارگانسیم گرم منفی را کاهش می دهد، موتاسیون های اضافی در ژن *gyrA* یا *gyrB* یا *parC* می تواند مقاومت را افزایش دهد. یک مکانیسم قابل قبول جهت توجیه اینکه چگونه این جانشینی ها باعث کاهش حساسیت می شوند، کاهش میل ترکیبی دارو است. در حمایت از این نظریه، نشان داده شده که جانشینی در یک یا دو جایگاه در نواحی QRDR ژیراز اشرشیا کلی، اتصال کوئینولون به کمپلکس آنزیم-DNA را کاهش می دهد. متناوباً، موتاسیون ها ممکن است عملکرد آنزیم هدف را معیوب کنند، بنابراین تشکیل کمپلکس های آنزیم-DNA کاهش پیدا می کند و دو رشته ای معیوب در DNA می شکند (۷۱). شایعترین موتاسیون مشاهده شده در اشرشیا کلی مقاوم به کوئینولون در کدون ۸۳ ژن *gyrA* است. در ایزوله های بالینی دومین موتاسیون از لحاظ فراوانی مربوط به کدون ۸۷ ژن *gyrA* می باشد. سوش ها با موتاسیون دوگانه در کدون های ۸۳ و ۸۷، MIC کوئینولون بالاتری دارند. این حقیقت برای میکروارگانسیم گرم منفی دیگر مانند سیتروباکتر فروندی، پسودوموناس آئروژینوزا، نیسریا گونه ره آ صدق می کند (۷۷). جایگزینی در موقعیت های مشابه فوق الذکر در آمینواسیدهای ۸۳ و ۸۷ اشرشیا کلی، در میکروارگانسیم های گرم مثبت نیز مکرراً در مقاومت کوئینولون نقش دارند. در سوش های سالمونلا تایفی موریوم مقاوم به کوئینولون یک موتاسیون در کدون ۱۱۹ رخ داده که باعث جایگزینی آلانین با گلوتامیک اسید یا والین شده است. این کدون در خارج از منطقه QRDR در ایجاد مقاومت به نالیدیکسیک اسید نقش دارد. یک موتاسیون در این کدون با جایگزینی سرین به جای آلانین-۱۱۹ ایجاد می شود که در اسیتوباکتر باومانی رخ داده است. واکنش بین آمینواسید ۸۳ GyrA با رادیکال موقعیت

۱- کوئینولون ها پیشنهاد شده است، درحالی که آمینو اسید ۸۷ *GyrA* با رادیکال موقعیت ۷ واکنش نشان می دهد. این مدل همچنین برای امینواسید ۸۰، ۸۴ مربوطه به *ParC* کاربرد دارد. بنابراین جایگزینی امینواسید های مختلف با این جایگاه ها ممکن است بر میل ترکیبی به مولکول های کوئینولون تاثیر بگذارد. بعلاوه موتاسیون در جایگاه های دیگر ممکن است بر ساختار کلی پروتئین تاثیر گذاشته و در برهمکنش کوئینولون ها تاثیرگذار باشد. در ژن *gyrB* باکتری اشیریشیا کلی جایگزینی هایی که باعث مقاومت به کوئینولون ها می شوند در موقعیت های ۴۲۶ (آسپارتات-۴۲۶ به آسپارژین) و ۴۴۷ (لیزین-۴۴۷ با گلوتامیک اسید) رخ می دهند. جایگزینی در موقعیت ۴۲۶ به نظر می رسد که نسبت به هر کوئینولونی ایجاد مقاومت می کند. درحالیکه موتاسیون در موقعیت ۴۴۷ باعث افزایش میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید شده، اما حساسیت به کوئینولون های فلورینه شده را افزایش می دهد. دستکاری در موقعیت های مشابه برای میکروارگانسیم های گرم مثبت نیز به همین صورت است. در سالمونلا تایفی موریوم جایگزینی اسید آمینه سرین با تیروزین در موقعیت ۴۶۳ رابطه ای با ایجاد مقاومت نسبت به کوئینولون داشته است. درمیان دیگر میکروارگانسیم ها در ژن *parC* مربوط به باکتری اشیریشیا کلی، معمول ترین جایگزینی در کدون ۸۰ و ۸۴ اتفاق می افتد. جایگزینی دیگری در اشیریشیا کلی (گلایسین-۷۸ با آسپارتیک اسید) به دست آمده از موتانت های مقاوم به کوئینولون، هم در آزمایشگاه هم در ایزوله های بالینی مشخص گردیده است. یک جایگزینی در ژن *parC* در موتانت های *invirto* آزمایشگاهی شیگلا فلکسنری مشخص شده است که در موقعیت ۷۹ اثر می گذارد (آسپارتیک اسید با آلانین). دیگر جایگزینی ها در موقعیت مشابه در دیگر میکروارگانسیم ها هم گرم منفی مانند هموفیلوس آنفلوانزا، آسپارتیک اسید با آسپارژین و هم در گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس پنومونیه، آسپارتیک اسید با آسپارژین پیدا شده است. اگرچه در هر مورد، آنها همراه با دیگر موتاسیون ها در *gyrA* یا *parC* پیدا

شده بودند. تا به امروز فقط یک موتاسیون در *grlA* استافیلوکوکوس اورئوس، از کدون ۱۱۶ رخ داده که از تغییر اسید آمینه آلانین به گلوتامیک اسید یا پرولین ایجاد می شود. این کدون یک آنالوگی از کدون ۱۱۹ پروتئین *GyrA* در سالمونلا تایفی موریوم است. به طور مشابهی، موتاسیون در دیگر کدون ها مانند ۲۳ (لیزین با آسپارژین)، ۴۹ (آسپارتیک اسید با تیروزین)، ۱۷۶ (آلانین با گلیسین)، یا ۴۵۱ (پرولین با گلوتامین) در استافیلوکوکوس اورئوس رخ داده است. اما اثری که آنها بر روی حساسیت به کوئینولون دارند هنوز مشخص نشده است. نقش جایگزینی اسید آمینه در *ParE* منجر به ایجاد ایزوله های بالینی مقاوم به کوئینولون در میکروارگانسیم های گرم منفی شده است که هیچ رابطه ای با هم ندارند.

در حقیقت فقط یک جایگزینی (لوسین ۴۴۵ با هیستیدین) در ژن *parE* از یک موتانت اشرشیا کلی آزمایشگاهی مقاوم به کوئینولون توصیف شده است. به علاوه این موتاسیون به نظر می رسد فقط بر روی MIC کوئینولون ها در حضور همزمان یک جهش در *gyrA* اثر می گذارد. تغییرات در این زیرواحد در میکروارگانسیم های گرم مثبت مقاوم به کوئینولون در هردو مورد *invitro* و *invivo* توصیف شده است. برای مثال در استرپتوکوکوس پنومونیه موتاسیون هایی که حاصل تغییراتی از آسپارتیک اسید-۴۳۵ با آسپارژین، هیستیدین-۱۰۲ با تیروزین هستند، پیدا شده است، درحالیکه در استافیلوکوکوس اورئوس تغییرات آمینواسیدی پرولین-۲۵ با هیستیدین ، گلوتامیک اسید-۴۲۲ با آسپارتیک اسید، آسپارتیک اسید-۴۳۲ با آسپارژین یا گلايسين، گلايسين-۴۵۱ با سرین یا گلوتامین و آسپارژین-۴۷۰ با آسپارتیک اسید توصیف شده اند. به هر حال امکان دارد که تعدادی یا همه این جایگزینی ها هیچ نقشی در ایجاد مقاومت نسبت به کوئینولون بازی نکنند، همانطوری که بعضی از محققین برای *S.pneumoniae* توصیف کرده اند (۷۷).

جدول ۲- موتاسیون در آمینواسیدهای زیر واحدهای GyrA و GyrB سویه های E.coli مقاوم به کوئینولون

Codon <sup>a</sup>	Wild amino acid	Mutations described
<b>GyrA</b>		
51 <sup>b</sup>	Ala	Val
67 <sup>b</sup>	Ala	Ser
81	Gly	Cys, Asp
82 <sup>b</sup>	Asp	Gly
83	Ser	Leu, Trp, Ala, Val
84	Ala	Pro, Val
87	Asp	Asn, Gly, Val, Tyr, His
106 <sup>b</sup>	Gln	Arg, His
<b>GyrB</b>		
426	Asp	Asn
447	Lys	Glu

جدول ۳- موتاسیون در زیر واحدهای ParC و ParE سویه های E.coli مقاوم به کوئینولون

Codon	Wild amino acid	Mutations described
<b>ParC</b>		
78	Gly	Asp
80	Ser	Ile, Arg
84	Glu	Lys, Val, Gly
<b>ParE</b>		
445	Leu	His

#### ۱- ۱-۷-۸-۲-۲ کاهش نفوذ پذیری آنتی بیوتیک (کاهش برداشت):

کاهش برداشت کوئینولون ممکن است که در ارتباط با دو فاکتور باشد: الف) افزایش در نفوذ ناپذیری باکتری به عامل ضد باکتریایی و ب) بیان بیش از اندازه پمپ های افلاکس (۷۷). کوئینولون ها ممکن است از دو راه مختلف وارد غشای خارجی شوند، از میان پورین ها یا از طریق انتشار از میان دولایه فسفولیپیدی. درجه انتشار یک کوئینولون به طور زیادی بستگی به میزان هیدروفوبیسیته (آبگریز بودن) آن دارد. همه کوئینولون ها ممکن است که از طریق پورین ها از غشای خارجی عبور کنند اما فقط آنهایی که دارای هیدروفوبیسیته بالایی هستند می توانند از غشای دولایه فسفولیپیدی عبور کنند. بنابراین تغییرات ایجاد شده در ترکیب پورین یا لیپولی- ساکارید ممکن است میزان حساسیت را تغییر دهد. در موتاسیون های معیوب کننده لیپولی ساکارید، افزایش حساسیت نسبت به کوئینولون های هیدروفوبیک بدون تغییر در میزان مقاومت به کوئینولون های هیدروفیلیک گزارش شده است (۷۷). کوئینولون ها برای رسیدن به اهداف خود، در باکتری های گرم مثبت باید از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی عبور کنند و در باکتری های گرم منفی باید از یک سد غشای خارجی اضافی نیز عبور کنند. باکتری های گرم منفی می توانند نفوذپذیری غشا را با تغییر بیان پروتئین های پورین غشای خارجی تنظیم کنند مانند پروتئین های غشای خارجی OmpA, OmpF و OmpC در اشرشیا کلی (۷۷،۷۱). یک کاهش در میزان بیان ompF با افزایش مقاومت به بعضی از کوئینولون ها مرتبط بوده ولی روی MIC کوئینولون های دیگر مانند توسوفلوکساسین یا پارفلوکساسین اثر نمی گذارد. به علاوه کاهش بیان ompF موجب کاهش حساسیت به عوامل آنتی باکتریال مختلف از جمله بتالاکتامازها، تتراسایکلین و کلرامفنیکل می شود (۷۷). پورین ها به دو کلاس تقسیم می شوند، اختصاصی و غیراختصاصی. در اشرشیاکلی ompC و ompF پورین های غیر اختصاصی هستند و به مولکول های قطبی کوچک اجازه ورود می دهند. نقص در این



پورین ها با مقاومت به آنتی بیوتیک ها مرتبط است. گونه های کلبسیلا ompK34، ompK35 و ompK36 را به عنوان پورین تولید می کنند. ایزوله های کلبسیلا پنومونیه پورین های ompK35 و ompK36 را بیان می کنند و ایزوله هایی که تولید کننده ESBLs هستند معمولاً تنها یکی از این پورین ها را کد می کنند که به طور نرمال ompK36 می باشد و یا اینکه این ایزوله ها هیچگونه پورینی را بیان نمی کنند. تغییرات در غشاء خارجی کلبسیلا پنومونیه فاکتور تعیین کننده افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی نمی باشد اما از دست دادن پورین باعث افزایش مقاومت می شود (۷۸).

بعضی مناطق کروموزومی مانند MarRAB که شامل سه ژن: *marR* که پروتئین ممانعت کننده (repressor) را بیان می کند، *marA* که یک فعال کننده رونویسی را کد می کند و *marB* که یک پروتئین با عملکرد ناشناخته ای را کد می کند، یا *SoxRS* این اپرون نیز دو پروتئین را کد می کند، *SoxR* که یک پروتئین تنظیم کننده می باشد، *SoxS* که یک فعال کننده رونویسی می باشد، هم میزان بیان ompF و هم میزان بیان پمپ افلاکس را در اشریشیا کلی تنظیم می کند (۷۷).

نشان داده شده است که کلرآمفنیکل، تتراسایکلین و سایر سوبستراها مانند سالیسیلات ها ممکن است بیان MarA را القا کرده موجب افزایش بیان micF شود که خود یک تنظیم کننده آنتی سنس است که سرکوب سنتز ompF را بعد از رونویسی القا می کند. بیان micF ممکن است توسط اپرون SoxRS تنظیم شود. همچنین اپرونهای SoxRS و MarRAB در اشریشیا کلی میزان بیان سیستم پمپ های برون ریز مانند AcrAB را تنظیم می کنند. موتاسیون هایی که با اثر بر *marR* بیان دائمی اپرون را القا می کنند موجب ایجاد فنوتیپ چند مقاومتی می شوند (۷۷).

بعلاوه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، سیستم های افلاکس وابسته به انرژی غیر اختصاصی دارند که برخی از آنها بصورت ترکیبی بیان می شوند و برخی از آنها توسط سیستم های تنظیمی کنترل می شوند یا بوسیله موتاسیون القا می شوند. پمپ های افلاکس نقش بسیار مهمی را در مقاومت آنتی بیوتیکی بازی می کنند. این مکانیسم اولین بار در اشرشیاکلی مقاوم به تتراسایکلین توصیف شد. این پروتئین ها آنتی بیوتیک را از محیط داخل سلول باکتری به بیرون انتقال می دهند. علاوه بر آن از دیگر عملکرد های این پمپ ها در باکتری ها می توان جذب مواد غذائی ضروری و یون ها، دفع مواد زائد و ارتباط باکتری با محیط را نام برد (۷۹).

در اشرشیا کلی، پمپ افلاکس AcrAB-TolC نقش مهمی در انتشار کوئینولون ها به خارج سلول ایفا می کند و چندین کنترل دارد. موتاسیون در ژن *acrR* (مهارکننده ژن *acrAB*) فعالیت پمپ را افزایش می دهد. برعکس، موتاسیونی که ژن *marR* را غیر فعال می کند (مهار کننده ژن *marA*) اجازه می دهد که پروتئین MarA ژن *acrAB*، *tolC* و یک ژنی که ترجمه ژن *ompF* را کاهش می دهد را فعال کند، بنابراین در مجموع ورود کوئینولون ها به داخل سلول کاهش و خروج آنها از سلول افزایش پیدا می کند. پسودوموناس آئروژینوزا چهار پمپ افلاکس دارد که می توانند کوئینولون ها و سایر مواد ضد میکروبی را به خارج سلول بفرستند (۷۷). سیستم های افلاکس مختلفی که کوئینولون را به خارج پمپ می کنند در پسودوموناس آئروژینوزا مانند MexAB-OprM، MexCD-OprJ و MexEF-OprN شناسایی شده اند.

چهارمین سیستم برون ریز با نام MexXY که توانایی پمپ کردن کوئینولون ها به خارج را دارد نیز شناسایی شده است اما قالب خواندن باز (ORF) متناظر با یک پروتئین غشای خارجی در پایین دست MexXY پیدا نشده است. در واقع امکان دارد که OprM (که پایین دست MexAB کد می شود) به عنوان پروتئین غشای

خارجی این سیستم برون ریز عمل کند. اختلال در OprM باعث ایجاد میزان حساسیت بیشتری نسبت به اختلال در MexA یا MexB در مواجهه با تعدادی از عوامل آنتی میکروبی می شود، که این بخاطر وجود یک پروموتور ضعیف در ژن MexB بالادست ژن OprM است که بیان OprM را در نبود بیان اجزای دیگر اپرون MexAB-OprM تسهیل می کند، اشاره ای دارد به این که OprM ممکن است در میزان مقاومت ذاتی نسبت به عوامل آنتی میکروبی از طریق همکاری با دیگر اجزای غشای داخلی و پری پلاسمیک نقش داشته باشد. پمپ های برون ریز دیگر در ارتباط با افزایش میزان مقاومت به کوئینولون در اشريشيا کلي و دیگر باکتری های گرم منفی مشخص شده است (۷۷). پمپ های افلاکس همچنین در استنوتروفوموناس مالتوفیلیا و اسپیتو باکتر باومانی یافت شده اند. در استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت به کوئینولون با افزایش بیان ژن *norA* همراه است، ژنی که کد کننده یک ناقل وسیع الطیف برای فلوروکینولون ها و سایر عوامل است (۷۱). *NorA* یک پمپ برون ریز وابسته به ATP است که توانایی خارج کردن کوئینولون های هیدروفیلیک مانند انوکساسین یا نورفلوکساسین را داشته اما بر روی کوئینولون های آبگریز مانند پارفلوکساسین اثر ندارد. این پمپ برون ریز می تواند مولکول های دیگری مانند رنگ های بازی، پورومايسين یا کلرآمفنیکل را دفع کند.

دو نوع سکانس DNA متفاوت شناخته شده اند که پمپ های برون ریز *NorA* با ارتباط خیلی نزدیک به هم را کد می کنند، اما تا به امروز هیچ سوش حمل کننده هر دو نوع سکانس با همدیگر یافت نشده است، از این رو پیشنهاد شده که این دو سکانس آلل های مختلف یک ژن می باشند. دو پمپ برون ریز وابسته به *NorA*، *Bmr* و *Blt* در باسیلوس سوبتیلیس شناخته شده است. بیان بالای این دو پمپ طیف مقاومت مشابهی با *NorA* ایجاد می کند. همچنین وجود سیستم های برون ریز شبیه *NorA* در میکروارگانيسم های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس پنومونیه یا استرپتوکوکوس گروه ویریدانس توصیف یا پیشنهاد شده است (۷۷).

افلاکس باعث مقاومت در استرپتوکوک پنومونیه و سایر باکتری های گرم مثبت و مایکو باکتریوم ها می شود. پمپ های افلاکس غیر اختصاصی همچنین می توانند در پاسخ به انواعی از ترکیبات دیگر مانند آنتی بیوتیک های غیر کینولون، ضد عفونی کننده ها، دترجنت ها و همچنین سدیم سالیسیلات فعال شده باشند. مکانیسم های تغییر هدف و فعالیت افلاکس اغلب با هم در ایزوله های بالینی مقاوم یافت می شوند. در واقع در اشرشیا کلی در غیاب پمپ افلاکس AcrAB، موتاسیون ژن *gyrA* بندرت MIC کوئینولون ها را افزایش می دهد. حتی با یک سیستم افلاکس کارآمد، موتاسیون به تنهایی در ژن *gyrA* باعث افزایش نسبتا کمی در MIC می شود، بنا براین آنها از نظر بالینی حساس تلقی می شوند (MIC سیپروفلوکساسین کمتر از ۱ میکروگرم/میلی لیتر). فقط با یک موتاسیون ثانویه در *gyrA* یا *parC* آنها از نظر بالینی مقاوم می شوند ( $MIC \geq 4 \mu g/mL$ ). بطور کلی یک ایزوله بالینی مقاوم تر دارای موتاسیون های مقاومت به کوئینولون بیشتری است. در اصل، یک کوئینولون که هر دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز ۴ را هدف قرار می دهد به همان اندازه احتمال مقاومت موتاسیونی را کاهش می دهد، زیرا موتاسیون در یک هدف هنوز سلول را حساس نگه می دارد (۷۱). اخیرا باچرون و همکارانش که با سوش های سالمونلا تایفی موریوم حاوی آمینواسید های جایگزین شده در GyrA (سرين-۸۳ با آلانین و آسپارتیک اسید-۸۷ با آسپارژین)، ParC (سرين-۸۰ با ایزولوسین) و GyrB (سرين-۴۶۴ با فنیل الانین) کار می کنند، نشان داده اند که پمپ برون ریز AcrAB ارتباط زیادی با ایجاد مقاومت به کوئینولون در سالمونلا تایفی موریوم دارد. این مطالعه نشان داد که مختل کردن (با آرژنین فنیل الانین بتا نفتیل آمید) یا مهار اپرون AcrAB منجر به کاهش در MIC همه کوئینولون ها شده است (برای مثال MIC سیپروفلوکساسین از ۳۲ mg/L به ۲-۴ mg/L کاهش یافت، MIC انروفلوکساسین از ۶۴ mg/L به ۲ mg/L کاهش یافت، MIC ماربوفلوکساسین از ۳۲ mg/L به ۲-۴ mg/L کاهش یافت). (۷۷).

حساسیت هدف می تواند بصورت آنزیمی یا ژنتیکی اندازه گیری شود. متأسفانه روش های مختلف جواب های مختلفی می دهند، با اندازه گیری *supercoiling* و *decatenation*، ژمی فلوکسازین فعالیت مهاری برابری بر علیه DNA ژیراز یا توپوایزومراز خالص شده استرپتوکوک پنومونیه دارد، اما با اندازه گیری تثبیت کمپلکس قابل شکستن، توپوایزومراز- $\epsilon$ ، ده بار حساس تر است. برخی از محققین دریافتند که ایزوله استرپتوکوک پنومونیه حساس که در معرض ژمی فلوکسازین بوده، ممکن است در ژن *gyrA* موتاسیون داشته باشد، نشان می دهد که ژیراز ژن حساس تری است. در استافیلوکوکوس اورئوس، ژمی فلوکسازین همچنین ژیراز و توپوایزومراز- $\epsilon$  خالص شده را بطور مشابه در *in vitro* هدف قرار می دهد، اما موتاسیون اولیه فقط در توپوایزومراز- $\epsilon$  رخ می دهد، نشان دهنده این است که هدف مورد نظر است. ممکن است کوئینولون دوکاره وجود داشته باشد، اما حداقل برای باکتری های گرم مثبت، پیدا کردن معیارهایی برای سودمندی بالینی دشوار است (۷۷).

جدول ۴- پمپ های افلاکس مسئول مقاومت میکروارگانیسم های گرم مثبت

Microorganism	Efflux system
<i>B. subtilis</i>	Blt BmrA Bmr3
<i>S. aureus</i>	NorA
<i>S. pneumoniae</i>	PmrA

جدول ۵- پمپ های افلاکس مسئول مقاوت کوئینولون در میکروارگانیسم های گرم منفی

Microorganism	Efflux system
<i>A. baumannii</i>	AdeABC
<i>C. jejuni</i>	CmeABC
<i>E. coli</i>	AcrAB <sup>a</sup> AcrEF EmrAB MdfA YdhE
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM MexCD-OprJ MexEF-OprN MexXY-OprM
<i>S. maltophilia</i>	SmeDEF
<i>Vibrio cholerae</i>	VceAB
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NorM

۱-۷-۸-۲-۳ پلاسمیدی که سلول را از اثرات کشندگی کوئینولون ها محافظت می کند:

پلاسمیدها نیز می توانند بطور مستقیم باعث مقاومت به کوئینولون شوند. مقاومت به کوئینولون بواسطه پلاسمید مدت زمان زیادی نیست که وجود دارد، اولین بار در یک ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه در آلاباما کشف شد که سطح پایینی از مقاومت به کوئینولون را در اشرشیا کلی و سایر باکتری های گرم منفی منتقل می کرد. پلاسمید MIC همه کوئینولون های مورد آزمایش را افزایش داد بجز coumermycin A که یک مهارکننده عملکرد GyrB غیر کوئینولونی است. بدلیل اینکه پلاسمید روی غلظت داخل سلولی کوئینولون ها یا بیان پورین های غشای خارجی اثر ندارد و بدلیل اینکه پلاسمید مقاومت در سویه های اشرشیا کلی که موتاسیون در ژن های *gyrA*، *gyrB*، *parC*، *ompF*، *ompC* یا *marR* داشته اند را افزایش می دهد، یک مکانیسم جدید مقاومت پیشنهاد شد. ژن مقاومت کینولونی بواسطه پلاسمید "*qnr*" نامیده شد. ژن کلون شد و مشاهده شد که یک پروتئین ۲۱۹ اسید آمینه ای پتتا پتیدی تولید می کند، که اعضای آن در واکنش پروتئین-پروتئین درگیر هستند. پروتئین خالص شده Qnr به هر دو آنزیم DNA ژیراز و توپوایزومراز-۴ متصل می شود و آنها را از اثر مهار سیپروفلوکساسین محافظت می کند. زمانی که یک تحقیقی روی سایر پلاسمیدهای حامل ژن *qnr* انجام شد، این ژن در بیش از ۳۰۰ سویه گرم منفی جمع آوری شده در طی دهه ۱۹۹۰ یافت نشد. تنها استثنا شامل سویه های جمع آوری شده طی یک دوره ۶ ماهه در سال ۱۹۹۴ در دانشگاه آلاباما در بیرمنگام، جایی که اولین بار ژن *qnr* تشخیص داده شد، بود. همچنین ژن *qnr* در ایزوله های بالینی اشرشیا کلی در شانگهای چین یافت شد که این ایزوله ها مقاومت بالایی به سیپروفلوکساسین داشتند. اگر چه پلاسمید های شانگهای و آلاباما که حامل ژن *qnr* بودند کاملاً متفاوت بودند، ژن های آنها تقریباً یکسان بود، تنها با

تغییرات تک نوکلئوتیدی که توالی اسید آمینه را تغییر نمی دهد. در بررسی های بیشتر همزمان سویه های بالینی از ایالات متحده ژن های *qnr* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر کلوآکه تشخیص داده شدند، همچنین در سویه هایی از مصر، کره و هلند گزارش شده است. بنابراین در حال حاضر *qnr* از نظر جغرافیایی بطور گسترده توزیع شده است. معمولاً پلاسمیدهای حامل ژن *qnr*، ژن های ESBL مانند CTX-M-9 یا SHV-7 و ژن های *AmpC* بتالاکتاماز مانند FOX-5 را نیز کد می کنند. این ارتباط می تواند یکی از دلایل فراوانی بالای مقاومت به کوئینولون در باکتری های مولد ESBL باشد. در پلاسمیدهایی که مورد مطالعه قرار گرفته اند، *qnr* در integron یا ساختار integron مانند در نزدیکی یک عنصر به نام Orf513 نقشه برداری شده است. Orf513 اعتقاد بر این است که یک recombinase درگیر در کسب جایگاه خاص ژن های مقاومت است، این موقعیت نشان می دهد که *qnr* از منابع دیگر کسب شده است اما منشأ آن هنوز شناخته نشده است. دو عضو از پروتئین های خانواده تکراری پتتا پتیدی حداقل در عملکرد با *qnr* مرتبط هستند. McbG یکی از پروتئین های تولید شده توسط سویه های سازنده microcineB17 می باشد که DNA ژیراز را هدف قرار می دهد. اعتقاد بر این است که McbG، DNA ژیراز را از خود مهار می محافظت می کند، همچنین حساسیت به تعدادی از کوئینولون ها را کاهش می دهد. دومین پروتئین مرتبط با Qnr، MfpA یک پروتئین کلون شده از ژنوم مایکوباکتریوم اسمگماتیس است که یک اثر ۴ برابری در حساسیت به سیپروفلوکساسین دارد. Qnr، McbG و MfpA کمتر از ۲۰٪ شباهت آمینواسیدی دارند، پس زیاد با هم مرتبط نیستند ولی حضورشان نشان می دهد که Qnr می تواند از یک پروتئین ایمنی طراحی شده باشد برای محافظت DNA ژیراز و توپوایزومراز IV از مهار کننده های طبیعی، بدلیل اینکه Qnr یک سطحی از مقاومت به کوئینولون ها را در مقایسه با موتاسیون اولیه در DNA ژیراز می دهد برای مثال: یک تغییر در



MIC سیپروفلوکساسین از ۰/۰۰۸ تا ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر. ژن *qnr* بنظر می رسد که آخرین یافته روی پلاسמיד باشد اما لزوما حرف آخر را در مقاومت باکتریایی به کوئینولون ها نمی زند. توانایی تجزیه کوئینولون ها در قارچ ها می تواند توسط باکتری ها کسب شود. سیستم های افلاکس وابسته به پلاسמיד برای سایر عوامل ضد میکروبی شناخته شده اند و اطلاعات ژنتیکی برای یک سیستم افلاکس در خانواده یکسان مانند *AcrAB-TolC* روی پلاسמיד قابل انتقال است. پلاسמיד های مقاومت از ایزوله های بالینی، می توانند ژن ایمنی میکروسین B17، *mcbG* را حمل کنند که فعالیت حفاظتی کمی بر علیه کوئینولون ها دارد و می توانند ژن هایی را کسب کنند برای سایر پروتئین هایی که طراحی شده اند تا DNA ژیراز و توپوایزومراز-۴ را از توکسین های طبیعی محافظت کنند، اما همچنان مقداری اثر ضد کوئینولون دارند (۷۱). اخیرا چهار گروه دیگر *qnrB*، *qnrS*، *qnrC* و *qnrD* (با زیر گروه های مختلف از جمله *qnrA1* و *qnrA2* و... که در چند اسید آمینه متفاوتند) شناخته شده است (۸۰). در سال ۲۰۰۵ دومین مکانیسم وابسته به پلاسמיד که با تغییر در مولکول آنتی بیوتیک عمل می کند شناخته شد. پروتئین aaC(6')-Ib-cr که واریانته از ۶ استیل ترانسفراز است، باعث ایجاد تغییر در ساختمان شیمیایی آمینو گلیکوزید ها شده و یک فعالیت آنزیمی وسیع روی سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین دارد (۸۱). مکانیزم سوم مقاومت پلاسمیدی اخیرا در *E. Coli* جدا شده از ژاپن مشاهده شده است. و منجر به شناسایی ژن *qepA* شد که پروتئین *qepA* را کد کرده و به عنوان پمپ افلاکس کینولون عمل می کند (۸۲).

#### ۳-۸-۷-۱ کسب و انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها

ارگانیسم های مقاوم به چندین دارو در برخی از باکتری ها از جمله کلبسیلا پنومونیه بدین شکل هستند که عملا "هیچ آنتی بیوتیکی برای درمان عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری ها وجود ندارد. مقاومت آنتی

بیوتیکی در باکتری ها ممکن است ذاتی باشد ( به عنوان مثال یک نوع خاص از ساختار دیواره سلولی را دارا باشد) که به طور طبیعی منجر به مقاومت می گردد یا ممکن است اکتسابی بواسطه موتاسیون در توالی نوکلئوتیدی یا کسب مقاومت از طریق عناصر ژنتیکی رخ دهد.

#### ۱-۳-۸-۷-۱ مقاومت ذاتی

در باکتری های گرم منفی، دیواره سلولی توسط غشاء خارجی احاطه شده که خاصیت نفوذ پذیری انتخابی در مقابل آنتی بیوتیک ها را ایجاد می کند. مثالی دیگر از مقاومت ذاتی در باکتری ها می توان به مقاومت ذاتی باکتری های بی هوازی اجباری در مقابل آمینوگلیکوزیدها را نام برد بدلیل آنکه مکانیسم ورود این آنتی بیوتیک ها از خلال دیواره سلول بواسطه نیروی پروتونی ایجاد شده در تنفس هوازی می باشد .

#### ۱-۳-۸-۷-۲ مقاومت اکتسابی

مکانیسم های متعددی توسعه پیدا کرده است که بواسطه آن باکتری ها مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها را کسب می کنند. این عمل با کسب عناصر ژنتیکی از دیگر باکتری ها به سهولت رخ می دهد. این نوع مقاومت به دو شکل کسب می شود :

۱- انتقال عمودی: بواسطه موتاسیون های خود به خودی در طی تکثیر باکتری که میزان آن  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$

می باشد ایجاد می شود که مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد شده و ژن های مقاومت به طور مستقیم از نسلی به نسل دیگر باکتری در طی همانندسازی DNA انتقال می یابند.

۲- انتقال افقی: فرآیندی است که طی آن عناصر ژنتیکی حاوی توالی DNA بین گونه های خاص

باکتریایی مشابه یا حتی در بین گونه های مختلف نیز انتقال می یابد. سه مکانیسم عمده در انتقال افقی

مقاومت ترانسفورماسیون، گونجوجاسیون و ترانسداکشن می باشد (۸۳).

## ۸-۱ کنترل و پیشگیری

بهداشت دست ها یک راه ساده در پیشگیری از عفونت می باشد. آلودگی دست ها می تواند ارگانیزم هایی را که ایجاد کننده عفونت هستند را انتقال دهد. شستن دست ها با آب و صابون موثر است. از دیگر راه های کنترل و پیشگیری ضد عفونی کردن محیط و محدود کردن مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها می باشد که نشان داده شده در پیشگیری از شیوع موثر است (۷۶).

## ۹-۱ درمان

در حال حاضر تعدادی از بیماری های عفونی با موفقیت بوسیله کوئینولون های خوراکی یا تزریقی درمان شده اند. کارایی بالینی برای عفونت مجاری تنفسی شامل برونشیت مزمن ناشی از عفونت های باکتریایی حاد، پنومونی اکتسابی از جامعه، ذات الریه بیمارستانی، و سینوزیت باکتریایی. کوئینولون ها همچنین برای درمان عفونت های دارای عوارض و برخی از انواع بدون عوارض، عفونت مجاری ادراری، عفونت پروستات باکتریال، عفونت پوست، عفونت سایر بافت های نرم، استخوان و عفونت مفصل، عفونت های گوارش ناشی از توکسین اشیریشیا کلی یا سالمونلا شامل تب های تیفوئید، پاراتیفوئید و ناقلین مزمن سالمونلا، عفونت شیگلا، کمپلوباکتر، آئروموناس، گونه های ویبریو و پلزیوموناس شیگوئیدس مؤثر واقع شده است. کوئینولون ها همچنین در درمان بیماری های مقاربتی نظیر عفونت های گونوکوکی و کلامیدیا، شانکروئید و عفونت های لگن مفید هستند. برخی کوئینولون ها در درمان بیماران با ایمنی تضعیف شده با نوتروپنیا بسیار مفید هستند (۶۷).

در حال حاضر در ایالات متحده آمریکا متداول ترین کوئینولون های تجویز شده عبارتند از لووفلوکساسین، سیپروفلوکساسین، گتی فلوکساسین و موکسی فلوکساسین. ژمی فلوکساسین در سال ۲۰۰۴ برای استفاده عموم در دسترس بود. سیپروفلوکساسین برای عفونت های دارای عوارض و بدون عوارض ادراری شامل سیستیت، پیلونفریت و پروستاتیت باکتریایی مزمن، عفونت های ادراری تناسلی بدون عوارض، گنوره مقعدی، پوست و سایر عفونت های بافت نرم، عفونت مفاصل و اسهال عفونی، تب تیفوئید، عفونت های داخل شکمی همراه با استفاده از مترونیدازول، سینوزیت، پنومونی بیمارستانی تایید شده است. سیپروفلوکساسین همچنین به عنوان درمان تجربی بیماران مبتلا به نوتروپنی تب زا، بعنوان پیشگیری و درمان آنتراکس و عفونت مجاری تنفسی تحتانی نظیر تشدید باکتریال برونشیت مزمن، پنومونی (ذات الریه غیر پنوموکوکی)، پنومونی بیمارستانی و عفونت با گونه های لژیونلا مورد تایید قرار گرفته است. لووفلوکساسین برای درمان عفونتهای مجاری ادراری بدون علامت شامل پیلونفریت و عفونت پروستات باکتریال مزمن، عفونت پوست، سینوزیت ماکزیلاری حاد، تشدید باکتریایی برونشیت مزمن، پنومونی اکتسابی از جامعه شامل انواع ناشی از استرپتوکوک پنومونیه مقاوم به پنی سیلین (PRSP)<sup>۳۰</sup> و استرپتوکوک پنومونیه مقاوم دارویی (MDRSP)<sup>۳۱</sup> و پنومونی بیمارستانی تایید شده است. گتی فلوکساسین برای درمان عفونتهای مجاری ادراری دارای عوارض و بدون عوارض شامل پیلونفریت، گنوره ادراری تناسلی بدون عواض، عفونت های پوست و ساختارهای پوستی، سینوزیت حاد و تشدید حاد برونشیت باکتریال مزمن و پنومونی اکتسابی از جامعه شامل PRSP و MDRSP مورد تایید است (۶۷).

penicillin resistant streptococcus pneumoniae<sup>30</sup>  
multidrug resistant streptococcus pneumoniae<sup>31</sup>

موکسی فلوکساسین برای درمان سینوزیت باکتریال حاد، عفونت های پوستی، موارد حاد برونشیت مزمن باکتریایی و پنومونی اکتسابی از جامعه شامل PRSP و MDRSP تایید شده است. ژمی فلوکساسین برای درمان موارد حاد باکتریال برونشیت مزمن و پنومونی اکتسابی از جامعه با شدت کم تا متوسط تایید شده است. ذکر این نکته حائز اهمیت است که اگرچه یک کوئینولون ممکن است برای درمان یک عفونت خاص تایید شده باشد، ملاحظات باید پیرامون حساسیت ارگانسیم عامل عفونت در نظر گرفته شود. در این زمینه همه کوئینولون ها برابر نبوده و نباید به جای یکدیگر استفاده شوند. برای استفاده مؤثر از آنها پزشکان باید با ویژگی های بالینی هر کوئینولون آشنا باشند، به عنوان مثال سیپروفلوکساسین همچنان بهترین گزینه برای درمان عفونت های ایجاد شده توسط باسیل های گرم منفی هوازی از جمله پسودوموناس آئروژینوزا حساس به دارو هستند. درمقایسه با رده های دیگر عوامل ضد میکروبی، استفاده از کوئینولون ها به ویژه برای درمان عفونت مجاری تنفسی بحث های زیادی را در بین محققان بالینی مطرح می کند. یک مسئله مهم ظهور مقاومت به کوئینولون ها است به ویژه در بین استرپتوکوکوس پنومونیه و جدیداً در مورد هموفیلوس آنفلوانزا. اگرچه در کل مقاومت نسبت به کوئینولون ها در پنوموکوک ها در حال حاضر اندک است ( $< 5\%$ ). وقوع مقاومت در حال افزایش است و نگرانی قابل توجهی به علت ادامه روند افزایشی مقاومت وجود دارد. نکته مهم این است که مقاومت در بین پنوموکوک ها به کوئینولون هایی مشاهده شده است که فعالیت نسبتاً کمی را در *In vitro* علیه پنوموکوک دارند، بنابراین این احتمال وجود دارد که استفاده از کوئینولون ها با بیشترین اثر علیه پنوموکوک در *In vitro* احتمال مقاومت در این پاتوژن ها را به تاخیر می اندازد. با این وجود مطالعات زیادی برای پاسخ به این مسئله مورد نیاز است (۶۷).

# فصل دوم

## اهداف و فرضیات

## ۱-۲ هدف اصلی طرح (General Objective):

تعیین الگوی مولکولی مقاومت به کوئینولون ها با واسطه پلاسمیدی *qnr* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از بیمارستانهای شهرهای قزوین و تهران

## ۲-۲ اهداف اختصاصی (Specific Objectives):

۱. تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها نسبت به مجموعه داروهای خانواده کوئینولون ها
۲. تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) سیپروفلوکساسین به روش آگار دیلوشن در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به فلوروکوئینولون ها
۳. تعیین فراوانی ژنوتیپ های *qnrA*، *qnrB* و *qnrS* در ایزوله های مقاوم به کوئینولون ها به روش

## PCR

## ۳-۲ اهداف کاربردی (Applied Objectives)

استفاده از یافته های این تحقیق به منظور شناسائی و تعیین وضعیت الگوی مولکولی مقاومتی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه نسبت به فلوروکوئینولونها و انتخاب صحیح آنتی بیوتیکهای مناسب برای بیماران درگیر با عفونتهای ناشی از این باکتری می باشد.

## ۴-۲ فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش:

۱. آیا ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به فلوروکوئینولون ها در بیمارستانهای شهرهای قزوین و تهران وجود دارند؟

۲. آیا ژنهای *qnr* در بروز مقاومت نسبت به کوئینولون ها در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مقاوم از آمار قابل توجهی برخوردار است؟

# فصل سوم

## بررسی متون



در مطالعه ای که توسط Jeong و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی ۳۴۷ ایزوله انتروباکتریاسه جدا شده از نمونه های بالینی مختلف در کره انجام شد، مشخص شد که در مجموع ۴۷ ایزوله (۱۳/۵٪) از نظر حضور ژن *qnr* مثبت بودند، در ادامه با انجام PCR مشخص گردید که ۶ ایزوله (۱۲/۷٪) حاوی ژن *qnrA1*، ۴۰ ایزوله دارای ژنهای *qnrB* (۸۵/۱٪) و یک ایزوله نیز از نظر حضور ژن *qnrS1* (۲/۱٪) مثبت بودند (۸۴).

در مطالعه دیگری که توسط Poirel و همکارانش در فرانسه بر روی ۱۸۶ ایزوله بالینی انتروباکتریاسه تولید کننده ESBL انجام شد، مشخص گردید که ۱۸۵ ایزوله مقاوم به نالیدیکیسک اسید بودند. از مجموع این ۱۸۶ ایزوله ۲/۲٪ از ایزوله ها حاوی ژن *qnrA1* و ۱/۶٪ حاوی ژن *qnrS1* بودند (۸۵).

در مطالعه ای که توسط CJ و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در تایوان بر روی ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه انجام شد، از مجموع ۲۳۴ ایزوله تولیدکننده ESBL، ۱۲۴ ایزوله (۵۳٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. با بررسی مولکولی مشخص شد ۲۶ ایزوله (۲۰/۹۶٪) دارای ژن *qnrB2*، ۱۹ ایزوله (۱۵/۳۲٪) دارای ژن *qnrB4* و ۱۳ ایزوله (۱۰/۴۸٪) از نظر حضور ژن *qnrS1* مثبت بودند. در این مطالعه ژن *qnrA* جدا سازی نشد (۸۶).

در مطالعه ای که توسط Deepak RN و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی ۶۱ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به نالیدیکیسک اسید در سنگاپور انجام شد، با بررسی مولکولی مشخص شد که ۲۸ ایزوله (۴۵/۹٪) از نظر حضور یکی از ژنهای پلاسمیدی *qnr* مثبت بودند. در این بین ۱۹ ایزوله (۶۷/۸۵٪) از نظر حضور ژن *qnrB* مثبت بودند. ۱۱ ایزوله دارای *qnrS* (۳۹/۲۸٪) و یک ایزوله (۳/۵۷٪) از نظر حضور ژن *qnrA* مثبت بودند. در این مطالعه ۲ ایزوله (۷/۱۴٪) همزمان دارای ژنهای *qnrB* و *qnrS* بودند (۸۷).

Wang و همکارانش ۴۱۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه را از نظر *qnrA*، *qnrB*، *qnrS* طی سالهای ۲۰۰۶-۲۰۰۵ بررسی کردند. ۹۲ ایزوله (۲۲/۷٪) *qnr* مثبت بوده اند که شامل ۱۰ ایزوله *qnrA* (۲/۴٪)، ۲۵ ایزوله *qnrB* (۶/۱٪) و ۶۲ ایزوله *qnrS* (۱۵/۱٪) بوده اند (۸۸).

Wang و همکارانش در مطالعه ای جداگانه مقاومت به کوئینولون ها (*qnr*) را در ۲۱۳ نمونه اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه که از نظر فنوتیپی مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند را در ۵ بیمارستان چین در سال ۲۰۰۸ مورد بررسی قرار دادند که ۱۹ ایزوله از اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه دارای ژن *qnr* بودند که غالبا از نظریه وجود ESBL نیز مثبت بودند (۸۹).

Lavila و همکارانش در بارسلونا ۳۰۵ نمونه کلینیکی تولید کننده ESBL را از نظر حضور ژنهای *qnr* در سالهای ۲۰۰۴-۲۰۰۵ مورد بررسی قرار دادند که ۱۵ ایزوله (۴/۹٪) از نظر حضور ژن *qnr* مثبت بودند. ژن *qnrA1* (۶ مورد در کلبسیلا پنومونیه، ۶ مورد در انتروباکتر کلوآک و ۲ مورد در اشرشیاکلی) دیده شد ضمن اینکه یک ایزوله نیز دارای ژن *qnrS1* بود. در میان این ایزوله ها ۳۹/۷٪ و ۶۹/۲٪ به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین حساس بودند. ۴ ایزوله مثبت از نظر *qnr* (۲۶/۷٪) دارای حداقل دوز مهارتی (256 MIC 32 mg/l) به نالیدیکسیک اسید بودند (۹۰).

Ferriera و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در پرتغال ۲۱ ایزوله کلبسیلا پنومونیه را از نظر مقاومت به بتالاکتامها و فلوئوروکینولون ها بررسی کردند. همه ایزوله ها مقاوم به نالیدیکسیک اسید و سیپروفلوکساسین بودند. ۱۹ ایزوله از میان این ایزوله ها دارای مقاومت حد واسط به نوروفلوکساسین و ۲ ایزوله مقاوم به نوروفلوکساسین بودند. ۶ ایزوله تولید کننده ESBL و ۱۵ ایزوله از ۲۱ ایزوله نیز (۷۱/۲۴٪) دارای ژن *qnr* بودند (۹۱).

Bouchakour و همکارانش در طی سالهای ۲۰۰۷-۲۰۰۸ تعداد ۳۹ ایزوله انتروباکتریاسه که در ارتباط با ESBL بوده اند را مورد مطالعه قرار دادند، که شیوع ژن *qnr* ۳۶٪ (n=14)  $qnrA=10.25\%$ ،  $qnrS=2.56\%$ ،  $qnrB=23.07\%$  گزارش شد. در این مطالعه شیوع ژن *qnr* در اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر به ترتیب ۱۸/۷٪، ۵۰٪ و ۶۲/۵٪ بود (۹۲).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ توسط هاشمی و همکارانش در همدان انجام شد در مجموع ۸۳/۳٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری مقاوم به نالیدیکسیک اسید و ۲۹/۶٪ مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند (۹۳).

# فصل چهارم

## مواد و روش ها

#### ۴-۱ جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:

کلیه ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاه های بیمارستانهای قدس، کوثر، رجائی، بوعلی و رازی شهر قزوین و بیمارستان های پارس، بقیه الله، فیاض بخش و هفت تیر شهر تهران می باشند.

جهت بر آورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده می شود. با در نظر گرفتن  $\alpha=0/05$ ، شیوع ژن های  $qnr$  در کلبسیلا پنومونیه  $P=0/25$  و دقت  $d=0/06$ ، تعداد ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته شد. ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده جهت انجام مراحل بعدی آزمون در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 200, p = 0.25, d = 0.06, 1 - \alpha = 0.95$$

نوع مطالعه توصیفی بوده و معیار ورود به مطالعه شامل:

۱- نمونه های ارسالی که از نظر رشد کلبسیلا پنومونیه مثبت باشند.

و معیار های خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد:

۲- نمونه های ارسالی که نتیجه کشت آن ها سایر باکتری های بجز کلبسیلا پنومونیه باشد.

۳- بیمارانی که نمونه های ارسالی آن ها تکراری باشد.

۴- نمونه های بیماران سرپایی

جدول ۶- جدول متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
انواع ژن های <i>qnr</i>					✓		انجام PCR و انجام الکتروفورز محصول PCR انجام الکتروفورز و بکارگیری سائز مارکرهای مربوطه و مشاهده چشمی باند	حضور دارد/ندارد
بخش بستری					✓			
نوع نمونه کلینیکی					✓			
مقاومت به فلوتور و کینولونها			✓				با استفاده از تست آنتی بیوگرام و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد	میلی متر
حداقل غلظت مهاری سیپروفلوکساسین			✓				تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد با استفاده از روش آگار دایلوژن	میکروگرم/میلی لیتر

## ۴-۱-۱ جمع آوری نمونه

تعداد ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، از بخش های مختلف بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران از اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تا فروردین ۱۳۹۲ جمع آوری شدند. ایزوله های باکتریایی از نمونه های بالینی ادرار، ترشه، خون و زخم جمع آوری شدند. ابتدا نمونه های بالینی در آزمایشگاه های بیمارستان های مورد مطالعه بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و مک کانگی آگار کشت داده شده و پس از رشد مجدداً پاساژ داده شده و به گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شدند. پس

از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، توسط آزمایش های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مربوط به شناسایی گونه کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفتند.

#### ۴-۲ آزمایش های تشخیصی فنوتیپی

تست های بیوشیمیایی که برای شناسایی گونه کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از:

۱. کشت بر روی محیط مکانکی آگار

۲. رنگ آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی

۳. انجام آزمون اکسیداز

۴. کشت بر روی محیط Triple Sugar Iron agar (TSI)

۵. آزمایش اندول (کشت بر روی محیط SIM)

۶. آزمایش متیل رد (کشت بر روی محیط MR-VP)

۷. آزمایش ووگس پروسکوئر (کشت بر روی محیط MR-VP)

۸. آزمایش سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)

۹. آزمایش اوره (کشت بر روی محیط اوره آگار)

۱۰. تست حرکت (کشت بر روی محیط SIM)

۱۱. آزمایش Lysine Decarboxylase (LD)

ایزوله های کلبسیلا پنومونیه باسیل های گرم منفی، اکسیداز منفی و لاکتوز مثبت بوده که در محیط TSI، سطح و عمق محیط را اسیدی و زرد کرده که همراه با تولید گاز می باشند. از نظر آزمون اندول و آزمون MR منفی

بوده و واکنش VP و آزمون سیترات مثبت می باشند. این ارگانسیم ها از نظر آزمون Lysine Decarboxylase مثبت بوده و در مجموع غیرمتحرک هستند و تست هیدرولیز اوره آنها نیز مثبت است (۲).

### تجزیه قند در محیط (TSI) Triple Sugar Iron Agar

در این محیط، پپتون، سولفات سدیم، قندهای لاکتوز، ساکارز (هر کدام ۰/۱٪)، گلوکز (۰/۱٪) وجود دارد. این محیط به صورت شیب دار در لوله ساخته می شود. معرف اصلی در این محیط فنل رد است که در pH اسیدی زرد و در pH قلیایی قرمز خواهد بود. سویه های کلبسیلا پنومونیه به علت تخمیر قندها رنگ این محیط را زرد نموده ولی قادر به تولید  $H_2S$  نمی باشند. همچنین تولید گاز در این محیط برای اغلب سویه ها مثبت خواهد بود.

### محیط اوره آز

در این محیط تولید آنزیم اوره آز توسط سویه های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار می گیرد. معرف این محیط فنل رد بوده که در صورت مثبت شدن واکنش، محیط قلیایی شده و معرف به رنگ صورتی در می آید.

### محیط SIM

برای بررسی تولید  $H_2S$  (Sulfide)، وجود آنزیم تریپتوفاناز در باکتری و تبدیل اسید آمینه تریپتوفان به اندول (Indol) و همچنین بررسی حرکت در این سویه ها، از این محیط استفاده می شود. معرف اندول کوکس بوده که در صورت تولید اندول به رنگ قرمز در می آید. حرکت باکتری نیز در این محیط با توجه به نیمه جامد بودن محیط قابل ردیابی است.



### محیط سیمون سیترات آگار (Simon Citrate Agar)

تنها منبع کربن در این محیط سیترات می باشد که سویه های کلبسیلا پنومونیه به علت دارا بودن آنزیم سیتراتاز، سیترات را به یکی از ترکیبات قلیایی تبدیل می کنند. معرف این محیط برموتیمول بلو بوده که در صورت واکنش، افزایش pH محیط باعث مشاهده رنگ آبی می گردد.

### محیط لیزین دکربوکسیلاز (Lysine Decarboxylase)

در این محیط چنانچه سویه های کلبسیلا پنومونیه آنزیم لیزین دکربوکسیلاز را تولید کنند، اسید آمینه لیزین به کاداورین (Codaverine) و  $\text{CO}_2$  تبدیل می شود. معرف موجود در این محیط برموتیمول پریل بوده که در صورت مثبت بودن واکنش، رنگ بنفش تیره حاصل می شود.

### محیط متیل رد- ووگس پروسکوفر (Methyl Red-Voges Proskauer)

این محیط مایع بوده که پس از تلقیح باکتری و ۲۴ ساعت گرما گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، آنرا در دو لوله تقسیم کرده که بتوان هر دو تست MR و VP را برای هر کدام از سویه ها انجام داد. معرف MR متیل رد بوده که در صورت مثبت بودن واکنش، بعد از اضافه کردن ۵ قطره متیل رد، رنگ صورتی تا قرمز مشاهده می شود. به لوله دیگر می توان معرف VP، ۶ قطره آلفا نفتول + ۲ قطره KOH اضافه کرد که بعد از قرار دادن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، در صورت انجام دکربوکسیلاسیون گلوکز و تولید محصول استیل متیل کاربینول محیط به رنگ صورتی یا قرمز مشاهده خواهد شد.

#### ۴-۲-۱ ذخیره سازی سویه های کلبسیلا پنومونیه

بعد از تعیین هویت ایزوله ها به منظور نگهداری طولانی مدت باکتری ها، ابتدا آن ها را در ویال های حاوی محیط تریپتی کیز سوی براث (TSB Broth) کشت داده و بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در صورت رشد باکتری یک یا دو قطره گلیسرول ۲۰٪ استریل به آن اضافه کرده و سپس تا زمان انجام تست های مطالعه در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

#### ۴-۲-۲ بررسی فنوتیپی حضور ژن های مقاومت در ایزوله ها در دو مرحله صورت گرفت:

##### الف) آزمون غربال گری آنتی بیوتیکی با روش انتشار از دیسک (Disk Diffusion Method)

آزمون با متد استاندارد کربی- بوئر (Kirby-Bauer) و بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای بین المللی آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد.

۱- محیط مولر هینتون آگار

۲- دیسک های آنتی بیوتیکی به همراه جدول استاندارد مربوطه

۳- لوله استاندارد نیم مک فارلند (Mac Farland)

۴- سوسپانسیون میکروبی

۵- سواب و پنس استریل

۶- سرم فیزیولوژی یا نرمال سالین

۷- خط کش میلیمتری جهت اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

برای انجام آزمون از دستور العمل CLSI به شرح زیر استفاده شد:

۱. ابتدا محیط مولر هیتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل

آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

۲. در مرحله بعد برای انجام آزمون، ظروف حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی نالیدیکسیک اسید،

سیپروفلوکساسین، گتی فلوکساسین، لووفلوکساسین و نورفلوکساسین، از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد

(نگهداری بلند مدت) به یخچال ۴ درجه سانتی گراد (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شدند. چند

دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق

برسند. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند.

۳. در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه شد. از آن جا که برای تهیه

سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد استفاده می شود، لذا

نمونه ها یک روز قبل از انجام آنتی بیوگرام بر روی محیط ژلوز ساده کشت داده شدند. سپس در دمای

۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزانی از کلونی را به لوله حاوی ۲ میلی لیتر

سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و بعد از مخلوط کردن با میکسر، کدورت سوسپانسیون به دست

آمده با کدورت نیم مک فارلند (ضمیمه ۱) تطبیق داده شد.

جدول ۷- ترکیب مواد برای تهیه لوله های استاندارد نیم مک فارلند

شماره لوله	۰/۵	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
کلرید باریم ۱/۱۷۵٪	۰/۰۵	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۱
اسید سولفوریک ۱٪	۹/۹۵	۹/۹	۹/۸	۹/۷	۹/۶	۹/۵	۹/۴	۹/۳	۹/۲	۹/۱	۹
دانسیته سلولی $\times 10^8$	۱/۵	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴	۲۷	۳۰

۴. سواب پنبه ای استریل به درون سوسپانسیون باکتریایی آماده شده غوطه ور شده و سپس بعد از فشردن سواب به دیواره جانبی لوله آزمایش برای تخلیه مایه اضافی، بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده و با عوض کردن زاویه کشت و چرخاندن سواب تمامی سطح را سه بار کشت می دهیم. ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی ذکر شده که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله حداقل ۲-۲/۲۵ سانتی متر از یکدیگر و همچنین از لبه پلیت جایگذاری شدند.

۵. پس از قرار دادن دیسک ها پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ سانتی گراد انکوبه شدند. سپس با استفاده از خط کش، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج مربوطه در فرم های تهیه شده ثبت شدند.

۶. طبق دستورالعمل CLSI، ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد دیسک نالیدیسیک اسید ( $30 \mu g$ )  $\geq 13$  میلی متر، دیسک سیپروفلوکساسین ( $5 \mu g$ )  $\geq 15$  میلی متر، دیسک گتی فلوکساسین ( $5 \mu g$ )  $\geq 14$

میلی متر، دیسک نورفلوکساسین ( $10\mu\text{g}$ )  $\geq 12$  میلی متر و دیسک لووفلوکساسین ( $5\mu\text{g}$ )  $\geq 13$

میلی متر باشد به عنوان ارگانیزم مقاوم محسوب می شود.

جدول ۸- مشخصات کلی آنتی بیوتیک های استفاده شده در این مطالعه و معیارهای بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر اساس CLSI

(۲۰۱۳)

تعداد	آنتی بیوتیک	مقدار دیسک بر حسب $\mu\text{g}$	علامت اختصاری	قطر هاله مقاومت	قطر هاله حد واسط	قطر هاله حساسیت
۱	نالیدیکسیک اسید	۳۰	NA	$\geq 13$	۱۴-۱۸	$\leq 19$
۲	سیپروفلوکساسین	۵	CIP	$\geq 15$	۱۶-۲۰	$\leq 21$
۳	گتی فلوکساسین	۵	GAT	$\geq 14$	۱۵-۱۷	$\leq 18$
۴	نورفلوکساسین	۱۰	NOR	$\geq 12$	۱۳-۱۶	$\leq 17$
۵	لووفلوکساسین	۵	LEV	$\geq 13$	۱۴-۱۶	$\leq 17$
۶	ایمی پنم	۱۰	IMI	$\geq 19$	۲۰-۲۵	$\leq 23$

ب) تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) با روش آگار دایلوژن

تعیین حداقل غلظت مهاري به روش آگار دایلوژن طبق توصیه موسسه استاندارد روش های آزمایشگاهی

(CLSI) برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین انجام گرفت. در این آزمون مطابق با جدول کنترل کیفی CLSI

از سویه استاندارد *E.coli* ATCC 35218 برای انجام کنترل کیفی آزمایش استفاده شد. تعیین MIC با

روش آگار دایلوژن برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین مطابق با دستورالعمل CLSI به شکل

زیر انجام و تفسیر شد.

۱. آماده کردن محلول های استوک آنتی بیوتیک

برای تعیین MIC سیپروفلوکساسین از پودر سیپروفلوکساسین (sigma) با درجه خلوص ۹۸، با استفاده از فرمول های زیر مقدار پودر مورد نیاز و حجم استوک اولیه محاسبه شد.

$$\text{Weight (mg)} = \frac{\text{volum (ml)} \times \text{concentration} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)}{\text{potency} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)}$$

ابتدا پودر سیپروفلوکساسین (sigma) را وزن کرده و به حجم رساندیم. در این مرحله از آب مقطر استریل به عنوان حلال و رقیق کننده استفاده شد. تعداد رقت های مورد نیاز با توجه به دستورالعمل CLSI مشخص و سریال هایی از رقت های مختلف تهیه کردیم. برای این منظور ابتدا محلول استوک سیپروفلوکساسین به غلظت ۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. بعد از استریل کردن بوسیله فیلتر، در حجم های ۱ میلی لیتری در میکروتیوپ های استریل پخش شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده و از آن جهت ساخت محلول کاری به غلظت ۵۱۲ در زمان آزمایش استفاده شد. سپس در هنگام آزمایش از این محلول کاری رقت های کاهنده دو برابر از غلظت ۵۱۲۰۰ تا غلظت ۲۵ آماده کردیم و از آن در مرحله بعد برای تهیه پلیت های حاوی مولر هیتون آگار آنتی بیوتیک دار با غلظت ۵۱۲ تا ۰/۲۵ استفاده شد. کلیه مراحل کار با استفاده از وسایل استریل و تحت شرایط آسپتیک انجام گرفت.

۲. تهیه کردن پلیت های آگار حاوی آنتی بیوتیک

برای هر رقت آنتی بیوتیکی، محیط مولر هیتون آگار بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده شد (۷/۲- pH: ۷/۴). پس از اتوکلاو و قرار دادن محیط در بن ماری با دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی گراد، محلول

سیپروفلوکساسین در غلظت های مختلف زمانی که آگار تا دمای مورد نظر خنک شد به آگار اضافه گردید برای این منظور به هر ۹۹ میلی لیتر آگار یک میلی لیتر از محلول های آنتی بیوتیکی با غلظت های مختلف که در مرحله قبل آماده شده بود اضافه و سپس روی یک سطح صاف درون پلیت ها ریخته شد تا عمق آگار به ۳-۴ میلی لیتر رسید که بعد از خنک شدن در دمای اتاق در یخچال نگهداری شدند. برای جلوگیری از کاهش اثر آنتی بیوتیک بهتر است هر چه زودتر استفاده شود.

### ۳. آماده کردن سوسپانسیون میکروبی و تلقیح آن

ابتدا از نمونه ها یک سوسپانسیون میکروبی دارای کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند ( $10^8 \times 1-2$ ) تهیه گردید، سپس به میزان ۱:۱۰ با سالین رقیق شد که تقریباً معادل ( $10^6 \times 1$ ) است سپس از این سوسپانسیون باکتریایی بعد از مخلوط کردن مقدار ۲ میکرولیتر با استفاده از میکروپیپت برداشته و بر روی محیط مولر هینتون آگار قرار دادیم. تلقیح نهایی روی آگار تقریباً معادل  $10^4$  CFU در هر نقطه می باشد. کلیه مراحل در شرایط کاملاً آسپتیک انجام شد. بعد از تلقیح نمونه ها پلیت ها در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۱۶-۲۰ ساعت انکوبه شد کلیه مراحل فوق بر روی یک پلیت فاقد آنتی بیوتیک بعنوان کنترل مثبت نیز انجام گرفت. هم چنین در هر پلیت خانه ای برای سویه استاندارد و کنترل منفی که تلقیح میکروبی در آن انجام نمی شود در نظر گرفته شد.

### ۵- تفسیر نتایج

بعد از اتمام مدت گرمخانه گذاری پلیت ها از انکوباتور خارج گشته و بر اساس رقت هایشان از رقت کم به سمت زیاد رقیق شدند. MIC هر سویه با ارزیابی رشد باکتری در نقطه تلقیح صورت گرفته و کمترین

غلظت آنتی بیوتیک که مانع از رشد باکتری شده است بعنوان حداقل غلظت مهاري آنتی بیوتیک مورد آزمایش در آن سوبه در نظر گرفته شد. لازم بذکر است رشد تنها یک یا دو کلنی بعنوان رشد مثبت در نظر گرفته می شود.

جدول ۹: تفسیر نتایج MIC سیپروفلوکساسین

مقاوم R	حدواسط I	حساس S
$\geq 4$	۲	$\leq 1$

مطابق با جدول شماره ۹ و بر اساس CLSI ایزوله هایی که MIC آن ها کمتر یا مساوی ۱ باشد حساس، ایزوله هایی که MIC آن ها ۲ باشد حدواسط و ایزوله هایی که MIC آن ها بیشتر و یا مساوی ۴ باشد بعنوان مقاوم در نظر گرفته شدند

#### ۳-۴ جداسازی مجموعه ژن های *qnrA* *qnrB1* *qnrB4* و *qnrS*

برای تعیین فراوانی ژن های پلاسمیدی کد کننده مقاومت به کوئینولون ها، *qnrA1-6* *qnrB1-3,5,6,8*، *qnrB4* و *qnrS1-2* از پرایمر های اختصاصی مطابق جدول ۱۰ استفاده شد، که با تکثیر ژن مورد نظر با شرایطی که گفته خواهد شد و نهایتاً الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز حضور یا عدم حضور آن ها مشخص گردید. در آزمون PCR از ایزوله های تائید شده کد کننده ژنهای *qnr* موجود در گروه، پس از تعیین توالی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

#### ۱-۳-۴ مراحل انجام آزمون ملکولی عبارتند از:



۶- استخراج DNA

۷- آماده سازی پرایمرها

۸- انجام آزمون PCR

۹- الکتروفورز

جدول ۱۰: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR جهت جداسازی ژنهای *qnr*

منبع	سایز (bp)	توالی الیگونوکلونیدی	پرایمر	ژن
90	564	5-ACG CCAGGATTTGAGTGAC-3 5- CCAGGCACAGATCTTGAC-3	qnrFma-F qnrFma-R	<i>qnrA1-6</i>
90	430	5-GGC ACT GAA TTT ATC GGC-3 5- TCC GAA TTG GTC AGA TCG-3	qnrB-F qnrB-R	<i>qnrB1-3, 5,6,8</i>
90	608	5-CCTACAATCATA CAT ATCGGC-3 5- GCTTCGAGAATCAGTTCTTGAC-3	qnrS-F qnrS-R	<i>qnrS1-2</i>
90	358	5-AGTTGTGATCTCTCCATGGC-3 5- CGGATATCTAAATCGCCCAG-3	qnrB4-F qnrB4-R	<i>qnrB4</i>

۴-۳-۱-۱ استخراج DNA:

مواد و وسایل مورد نیاز

- سمپلر و سر سمپلر

- میکروتیوب ۱/۵

- شیکر (Shaker)

- میکروسانتریفیوژ

- انکوباتور ۳۷ درجه

- بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد

- نانودراپ

- آب مقطر استریل

مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling به شرح ذیل انجام گرفت:

۱. برای استخراج DNA به روش boiling نیاز به کلنی هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) داریم، به این

منظور نمونه هایی که در آزمون فنوتیپی به هر یک از آنتی بیوتیک های کوئینلون مقاوم بودند، برای

استخراج DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و

رشد ایزوله های مورد نظر آماده استخراج شدند.

۲. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ $\mu$ l آب مقطر استریل

حل کردیم.

۳. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه ها را shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شوند.

۴. ویال ها را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد)، قرار دادیم به طوری

که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گیرد.

۵. سپس ویال ها را به مدت ۵-۱۰ دقیقه، با دور g ۱۴۰۰۰ ( با استفاده از سانتریفوژ اپندورف)، سانتریفوژ

کردیم و محلول رویی (سوپرناتانت) ویال ها که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR

به اپندورف استریل منتقل شد.



شکل ۵: دستگاه میکروسانتریفوژ مورد استفاده در مطالعه حاضر

۶. در این مرحله پس از استخراج، برای اطمینان از وجود DNA توتال، از دستگاه نانودراپ در دو طول

موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر استفاده شد.

۷. استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA

استخراج شده ذخیره نمی شد.

#### ۴-۳-۱-۲ آماده سازی پرایمر ها

۱- ابتدا توالی پرایمر های مورد استفاده جهت ساخت تحویل شرکت دانمارکی شد. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره بر طبق دستورالعمل ( برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

۲- در مرحله بعد ویال های حاوی پرایمر، به مدت ۰/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

۳- محلول استوک پرایمر  $100 \mu\text{mol}$  تهیه و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۴- برای انجام کار روزانه، محلول پرایمر با غلظت  $10 \mu\text{mol}$  از هر دو رشته فوروارد و ریورس تهیه و برای هر سری از واکنش های PCR استفاده شد.

#### ۴-۳-۱-۳ انجام آزمون PCR:

##### الف- مواد و وسایل موردنیاز

- ترموسایکلر (Applied biosystems ساخت کشور آمریکا)

- میکروسانتتریفیوژ

- میکروتیوب ۱/۵ و ۰/۲

- سمپلر و سر سمپلر

- شیکر

- پرایمر
- آب دیونیزه استریل
- $MgCl_2$
- PCR buffer
- dNTP
- Taq polymerase
- DNA template

#### ب- آماده سازی Mastermix

در این مرحله ابتدا Mastermix تهیه شد (جدول ۱۱). تمام مواد مورد نیاز برای ساخت Mastermix از شرکت ژن فن آوران تهیه شدند. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی تکثیر و شناسایی ژن های مورد نظر صورت گرفت. برای انجام واکنش های PCR، حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. برای به دست آوردن بهترین مقدار ترکیبات مورد استفاده ( مثل  $MgCl_2$  یا پرایمر)، گرادیانی از مقادیر مختلف این ترکیبات، طی چند واکنش مختلف PCR انجام شد.

جدول ۱۱: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
dNTP mix 10 mmol	2
PCR Buffer 10X	10
MgCl <sub>2</sub> 50 mmol	3
d.H <sub>2</sub> O	73

### ج-آماده سازی واکنش PCR:

با در نظر گرفتن حجم نهایی هر واکنش PCR که ۲۵ میکرولیتر بود، حجم پرایمر ها، DNA الگو و میزان

آنزیم پلیمرز که باید به Mastermix اضافه شوند به شرح ذیل در جدول (۱۲) آمده است

جدول ۱۲: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
Mastermix	21.75
DNA Template	1
Primer F	1
Primer R	1
Taq pol 5 u/μl	0/25

د- برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler):

پس از قرار دادن ویال ها در دستگاه ترموسایکلر، شرایط دمایی مختلف و زمان های آن ها در یک واکنش

PCR برای ژنوتیپ های مورد نظر که در جدول (۱۳) ذکر شده اجرا گردید.

جدول ۱۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر درواکنش PCR برای ژن های مورد نظر

ژن	initial denaturation	denaturation	Annealing	Extension	final extension
<i>qnrA1-6</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	49°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>qnrB1-3,5,6,8</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	49°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>qnrB4</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	53°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>qnrS1-2</i>	95°C for 5min	95°C for 1min	53°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min



شکل ۶: دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور امریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر



#### ۴-۱-۳-۴ الکتروفورز محصولات PCR:

##### مواد و وسایل مورد نیاز

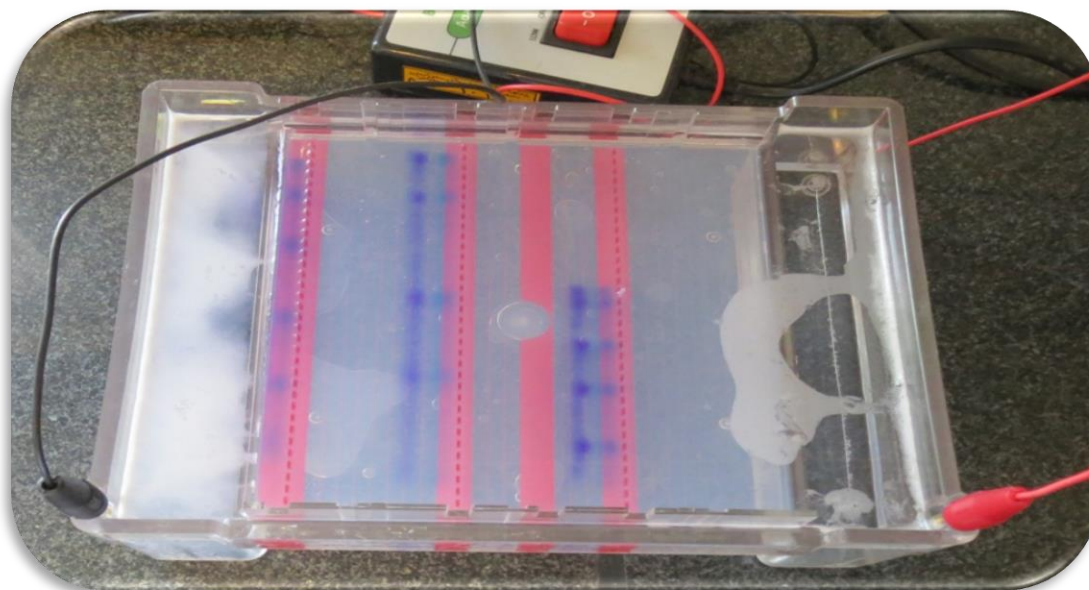
- پودر آگارز (Agarose)
- بافر 1X TBE (Tris-HCl Boric Acid EDTA)
- Loading Buffer (Fermentase)
- Marker (Ladder) (Fermentase)
- سینی ژل (Gel Tray)
- شانه ژل (Gel Comb)
- تانک الکتروفورز (Electrophoresis Tank)
- منبع تغذیه الکتریکی (Power supply)
- سمپلر و سرسمپلر (Tip)

##### تهیه بافر 1X TBE

برای تهیه بافر 10X TBE (ضمیمه ۱)، مواد مندرج در ضمیمه با مقادیر مربوطه مخلوط کرده و حجم نهایی محلول به ۱ لیتر رسانده شد. سپس بافر 1X TBE (ضمیمه ۲ و ۳) از بافر 10X تهیه و از آن در تانک الکتروفورز و تهیه ژل استفاده گردید.

## الکتروفورز

برای انجام الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. میزان ۱ گرم پودر آگارز را در 100 میلی لیتر بافر TBE 1X حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن به میزان ۱ میکرولیتر ( $10\mu\text{g/ml}$ ) ایتیدیوم بروماید ( برای رنگ آمیزی DNA) به آن اضافه کردیم. پس از مخلوط کردن، محلول را داخل قالب ریخته و پس از بسته شدن ژل، آن را از قالب خارج کرده و به داخل تانک الکتروفورز انتقال دادیم. مقدار هفت میکرولیتر از محصول PCR را با سه میکرولیتر Loading Buffer 6X مخلوط کرده و داخل چاهک های ژل برای الکتروفورز قرار دادیم. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ روی ۱۰۰ ولت تنظیم گردید، وقتی نمونه سه چهارم طول ژل را طی کرد، ژل را از تانک خارج و با لامپ UV مشاهده شد. در صورت مناسب بودن باند های حاصل از الکتروفورز، ژل را با دستگاه UVP مورد مشاهده قرار داده و از ژل مربوطه عکس تهیه کردیم.



شکل ۷: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر



شکل ۸: دستگاه Gel-Documentation مورد استفاده در مطالعه حاضر

#### ۴-۴ تعیین توالی (Sequencing)

محصول PCR هر یک از زن ها جداگانه ( *qnrS* ، *qnrB4* ، *qnrB1* ) از نظر تایید حضور ژن توسط شرکت ژن فن آوران به شرکت MacroGene کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی ها با نرم افزار chromas بررسی و سپس جهت آنالیز ابتدا در NCBI ، blast شده و با ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در این بانک ژنی alignment انجام شد.

# فصل پنجم

## نتایج و یافته ها

## ۱-۵ ایزوله های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک شهر و بیمارستان

طی مدت زمان اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تا فروردین ماه ۱۳۹۲ تعداد ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه دریافت شده از آزمایشگاه های بیمارستان های شهرهای قزوین (قدس، کوثر، بوعلی، رجائی و رازی) و تهران (فیاض بخش، هفت تیر، بقیه الله و پارس) جمع آوری و مجدداً در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی با انجام آزمایشات میکروب شناسی و بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفتند. تعداد نمونه ها به تفکیک شهر و بیمارستان ها به ترتیب در جداول (۱۶، ۱۴، ۱۵) آمده است.



شکل ۹: نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده در مطالعه حاضر

جدول ۱۴: تعداد ایزوله ها به تفکیک شهرهای مورد مطالعه

شهر	تعداد ایزوله ها	درصد %
قزوین	۱۳۶	۶۸ %
تهران	۶۴	۳۲ %
مجموع	۲۰۰	۱۰۰ %

جدول ۱۵: تعداد ایزوله ها به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد %
کوثر	۴۴	۲۲ %
قدس	۴۱	۲۰/۵ %
رازی	۳۶	۱۸ %
بوعلی	۹	۴/۵ %
رجائی	۶	۳ %
مجموع	۱۳۶	۶۸ %

جدول ۱۶: تعداد ایزوله ها به تفکیک بیمارستان های شهر تهران

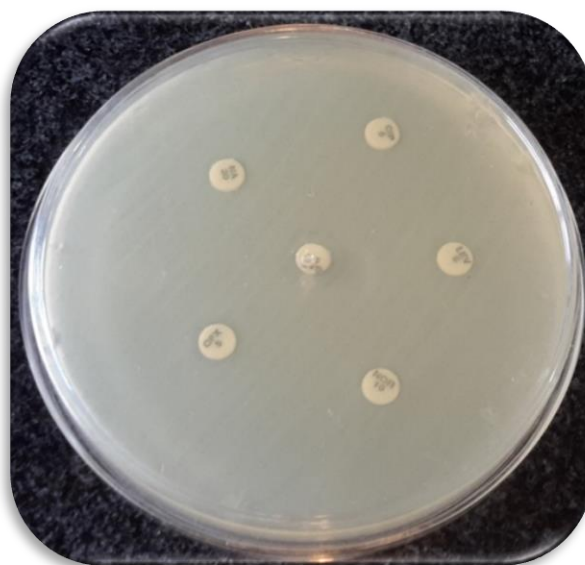
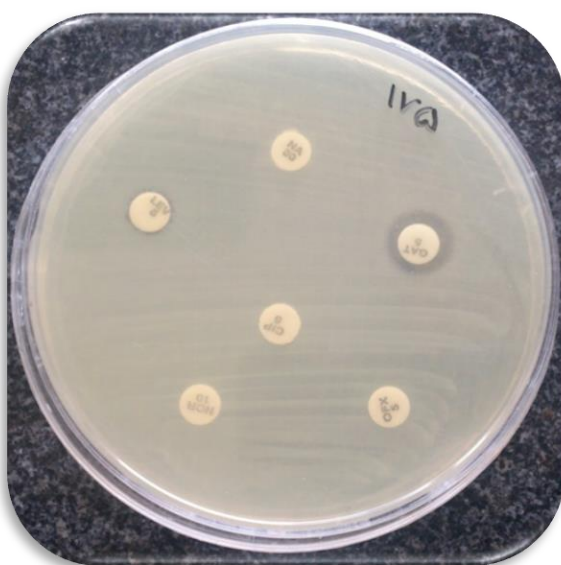
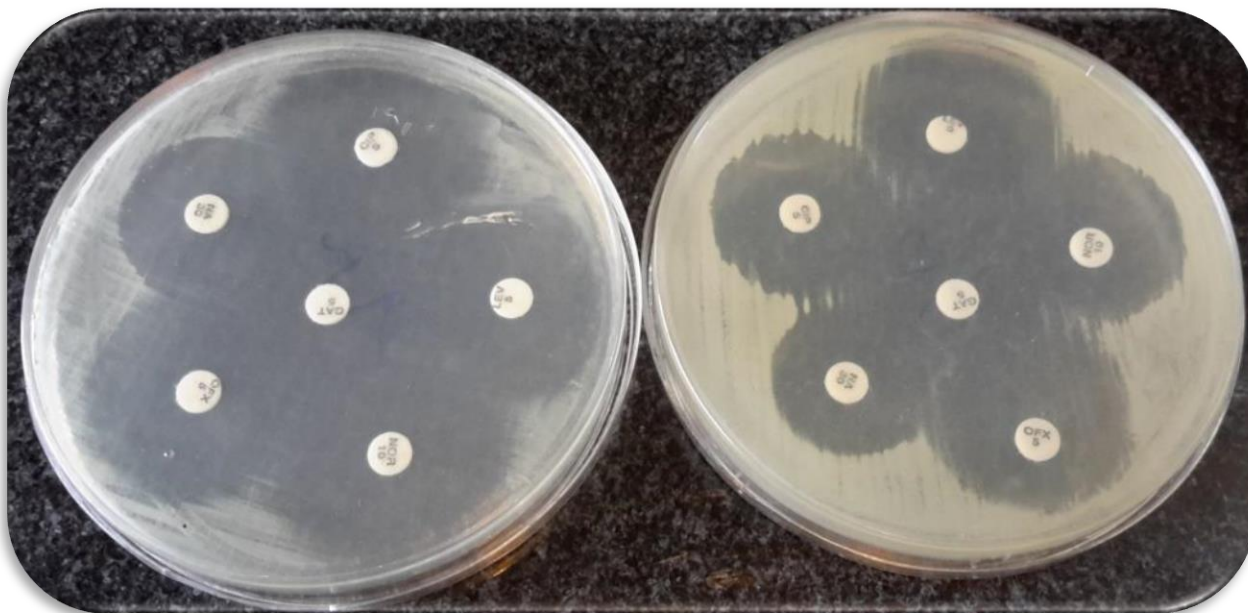
بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد %
فیاض بخش	۳۸	۱۹
هفت تیر	۱۴	۷٪
بقیه الله	۶	۳٪
پارس	۶	۳٪
مجموع	۶۴	۳۲٪

## ۲-۵ بررسی فنوتیپی وجود ایزوله های مقاوم به کوئینولون ها

### ۱-۲-۵ تست غربالگری آنتی بیوتیکی

در مجموع از بین ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه بعد از انجام تست غربالگری ، ۱۲۴ ایزوله (۶۲٪) کاهش حساسیت نسبت به یکی از آنتی بیوتیک های مورد استفاده در تست غربالگری نشان دادند، که از این میان ۸۸ ایزوله (۷۱٪) مربوط به شهر قزوین و ۳۶ ایزوله (۲۹٪) مربوط به شهر تهران می باشد. همانطور که در جدول (۱۷) آمده است، بیشترین میزان مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید با ۵۳٪ و سیپروفلوکساسین با ۳۳٪ می باشد و پس از آن به ترتیب گتی فلوکساسین با ۳۲٪، نورفلوکساسین ۲۲٪ و لووفلوکساسین با ۱۹٪ قرار دارند.





شکل ۱۰: نتایج بدست آمده از ارزیابی فنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک ها به روش دیسک دیفیوژن آگار



جدول (۱۷). میزان مقاومت ایزوله ها به آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری

آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله های مقاوم	درصد. %
نالیدیکسیک اسید	۱۰۶	۵۳. %
سیپروفلوکساسین	۶۶	۳۳. %
گتی فلوکساسین	۶۴	۳۲. %
نورفلوکساسین	۴۴	۲۲. %
لووفلوکساسین	۳۸	۱۹. %

جدول ۱۸: تعداد ایزوله های غیر حساس به کوئینولون به تفکیک شهر

شهر	تعداد ایزوله ها	درصد. %
قزوین	۸۸	۷۱. %
تهران	۳۶	۲۹. %
مجموع	۱۲۴	۱۰۰. %

جدول ۱۹: تعداد ایزوله های غیر حساس به کوئینولون به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد %
کوثر	۳۲	۲۵/۸
رازی	۲۷	۲۱/۸
قدس	۱۹	۱۵/۳
بوعلی	۶	۴/۸
رجائی	۴	۳/۲
مجموع	۸۸	۷۱

جدول ۲۰: تعداد ایزوله های غیر حساس به کوئینولون به تفکیک بیمارستان های شهر تهران

بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد %
فیاض بخش	۱۵	۱۲/۱
هفت تیر	۱۴	۱۱/۳
پارس	۴	۳/۲
بقیه الله	۳	۲/۴
مجموع	۳۶	۲۹

جدول ۲۱: تعداد ایزوله های غیر حساس به کوئینولون به تفکیک نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد ایزوله	در صد٪
ادرار	۵۱	٪۴۱/۱
تراشه	۵۰	٪۴۰/۳
زخم	۱۴	٪۱۱/۳
خون	۵	٪۴
آسیت	۴	٪۳/۲
مجموع	۱۲۴	٪۱۰۰

جدول ۲۲: تعداد ایزوله های غیر حساس به کوئینولون به تفکیک بخش های بیمارستان

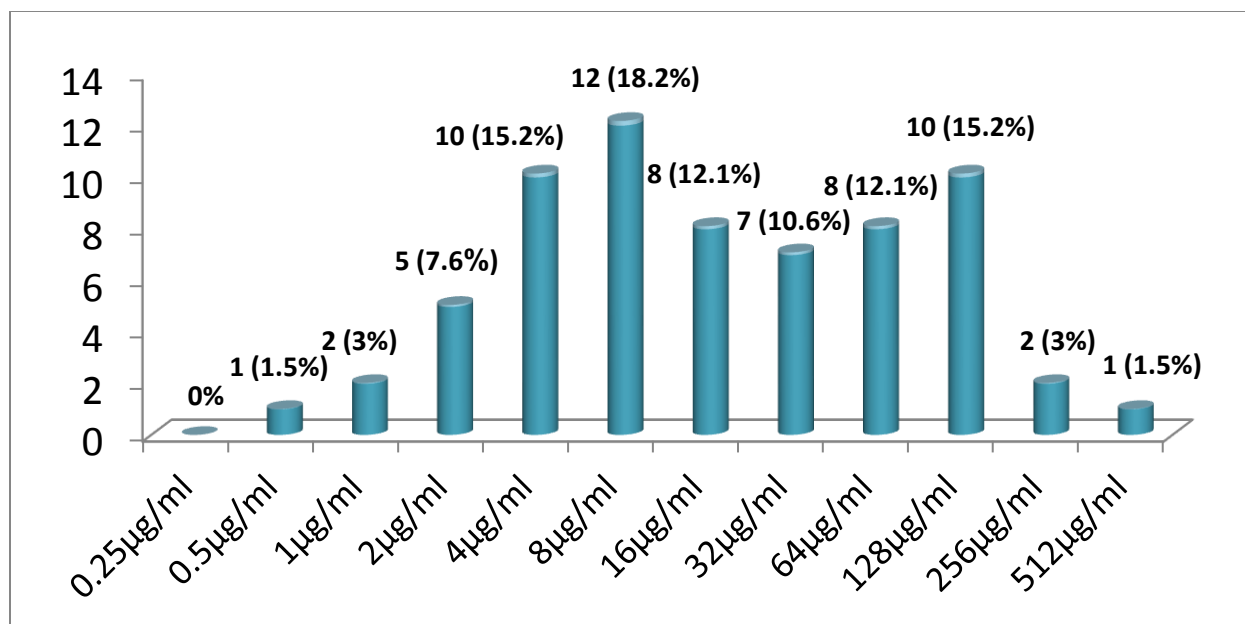
بخش	تعداد ایزوله	درصد٪
مراقبت های ویژه	۷۷	٪۶۲/۱
داخلی	۲۱	٪۱۶/۹
عفونی	۲۰	٪۱۶/۱
جراحی	۵	٪۴
ارتوپدی	۱	٪۰/۸

جدول ۲۳: تعداد ایزوله های غیر حساس به کوئینولون به تفکیک جنس

جنس	تعداد ایزوله	درصد٪
زن	۶۹	۵۵/۶٪
مرد	۵۵	۴۴/۴٪

جدول ۲۴: نتایج MIC برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین

غلظت آنتی بیوتیک	تعداد ایزوله ها	در صد٪
۰/۲۵	۰	۰٪
۰/۵	۱	۱/۵٪
۱	۲	۳٪
۲	۵	۷/۶٪
۴	۱۰	۱۵/۲٪
۸	۱۲	۱۸/۲٪
۱۶	۸	۱۲/۱٪
۳۲	۷	۱۰/۶٪
۶۴	۸	۱۲/۱٪
۱۲۸	۱۰	۱۵/۲٪
۲۵۶	۲	۳٪
۵۱۲	۱	۱/۵٪
مجموع	۶۶	۱۰۰٪



نمودار ۱: نمودار نتایج MIC برای ایزوله های غیر حساس به سیپروفلوکساسین

### ۳-۵ نتایج جداسازی ژن های *qnr*

با انجام آزمون PCR بر روی ایزوله های مقاوم به کوئینولون ها فراوانی ژن های پلاسمیدی دخیل در مقاومت سنجیده شد (جدول ۲۵). همانطور که در جدول ۲۵ آمده است *qnrB1* بیشترین فراوانی را در بین ژن های پلاسمیدی مسئول مقاومت به خود اختصاص داده است و پس از آن به ترتیب *qnrB4* و *qnrS1* قرار دارند. در این مطالعه ۳ (۲/۴٪) ایزوله بطور مشترک دارای ژن های *qnrB1* و *qnrB4* بودند. در این مطالعه ژن *qnrA* یافت نشد. همچنین همانگونه که در جدول ۲۶ آمده است فراوانی ژن های *qnr* در بخش مراقبت های ویژه از میزان بالاتری (۵۹/۲٪) نسبت به دیگر بخش ها برخوردار بوده است. شکل ۱۰ به ترتیب نتایج الکتروفورز ژنهای *qnrB1*، *qnrB4* و *qnrS* را نشان می دهد.

جدول ۲۵: فراوانی ژن های *qnr*

ژن های کد کننده <i>qnr</i>	تعداد ایزوله ها	درصد %
<i>qnrB1</i>	۳۵	۲۸/۲ %
<i>qnrB4</i>	۹	۷/۳ %
<i>qnrS1</i>	۲	۱/۶ %
<i>qnrA</i>	۰	۰
<i>qnrB1+qnrB4</i>	۳	۲/۴ %
مجموع	۴۹	۳۹/۵ %

جدول ۲۶: فراوانی ژن های *qnr* به تفکیک بخش های مختلف بیمارستان

بخش های بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد
ICU	۲۹	۵۹/۲ %
داخلی	۱۰	۲۰/۴ %
عفونی	۸	۱۶/۳ %
جراحی	۲	۴/۱ %
ارتوپدی	–	–
مجموع	۴۹	۳۹/۵ %

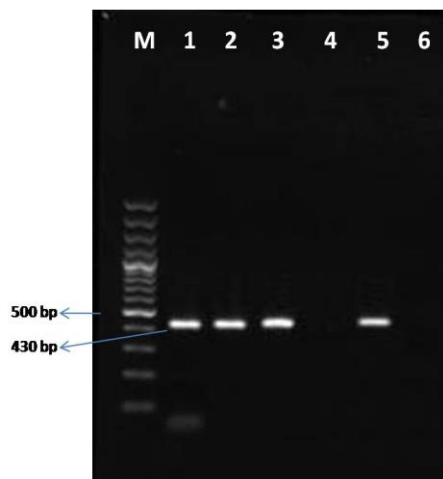
جدول ۲۷ : فراوانی ژن های *qnr* به تفکیک نوع نمونه

نوع نمونه	تعداد ایزوله	درصد
ادرار	۲۱	٪۴۲/۹
تراشه	۱۸	٪۳۶/۷
زخم	۶	٪۱۲/۲
آسیت	۳	٪۶/۱
خون	۱	٪۲
مجموع	۴۹	٪۳۹/۵

#### ۴-۵ یافته های آزمون مولکولی

##### ژن *qnrB1*

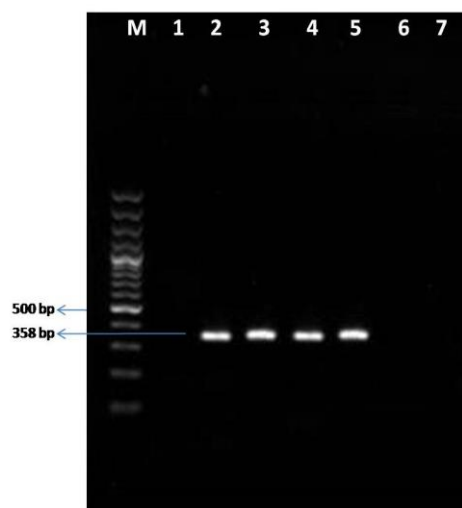
تمامی ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به کوئینولون ها مقاوم بودند با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن *qnrB1* مورد بررسی قرار گرفتند که ۳۵ (٪۲۸/۲) ایزوله دارای این ژن بودند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- نتایج ژل الکتروفورز ژن *qnrB1* - ستون M : DNA - مارکر، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون های ۲، ۳ و ۵: ایزوله های مثبت بالینی، ستون ۴: ایزوله بالینی منفی، ستون ۶: واکنش PCR بدون DNA الگو

### ژن *qnrB4*

تمامی ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به کوئینولون ها مقاوم بودند با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن *qnrB4* مورد بررسی قرار گرفتند که ۹ (۷۳٪) ایزوله دارای این ژن بودند (شکل ۱۲).

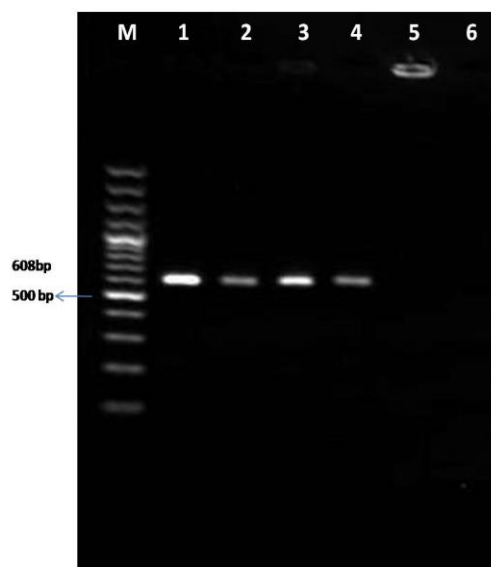


شکل ۱۲- نتایج ژل الکتروفورز ژن *qnrB4* - ستون M : DNA مارکر. ستون ۱: کنترل منفی؛ ستون ۲ تا ۵: ایزوله های مثبت بالینی؛ ستون ۶: ایزوله بالینی منفی؛ ستون ۷: واکنش PCR بدون DNA الگو

### ژن *qnrS*

تمامی ایزوله هایی که در روش دیسک دیفیوژن به کوئینولون ها مقاوم بودند با آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر حضور ژن *qnrS* مورد بررسی قرار گرفتند که ۲ (۱۶٪) ایزوله دارای این ژن بودند (شکل ۱۳).





شکل ۱۳- نتایج ژل الکتروفورس ژن *qnrS* - ستون M : DNA مارکر. ستون ۱: کنترل مثبت؛ ستون ۲ تا ۴: نمونه بالینی مثبت؛ ستون ۵: واکنش PCR بدون DNA الگو؛ ستون ۶: کنترل منفی

## ۵-۵ نتایج تعیین توالی محصولات PCR

نتایج تعیین توالی محصولات PCR با انجام همخوانی در سایت NCBI و بانک های اطلاعاتی مولکولی معتبر در خصوص ژن های مورد مطالعه همانطور که در اشکال ۱۴، ۱۵ و ۱۶ آمده است حاکی از تایید حضور ژن های *qnrB1*، *qnrB4* و *qnrS1* می باشد.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
QNRB1	ATGACGCCATTACTGTATATAAAATTTGACAGTGATTTTCAGGTGCCGACCTGAGCGGCACTGAATTTATCGGCTGTGATCTCTATGATCGTGAAGCCAGAAAGGGTGCAATTTTAGTCGTGCGATG													
MansouriB1	CAGGATATCGGGAGCCAGAAAGGGTGCAATTTTAGTCGTGCGATG													
Consensus	.....cagGATagcGaaAGCCAGAAAGGGTGCAATTTTAGTCGTGCGATG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
QNRB1	CTGAAGATGCCATTTTAAAGCTGTGATTTATCCATGGCGGATTTTCGCAATTCAGTGCCTGGGCATTGAATTCGCCACTGCCGCGCACAGGGCGAGATTTCCGCGGCGAAGCTTTATGATA													
MansouriB1	CTGAAGATGCCATTTTAAAGCTGTGATTTATCCATGGCGGATTTTCGCAATTCAGTGCCTGGGCATTGAATTCGCCACTGCCGCGCACAGGGCGAGATTTCCGCGGCGAAGCTTTATGATA													
Consensus	CTGAAGATGCCATTTTAAAGCTGTGATTTATCCATGGCGGATTTTCGCAATTCAGTGCCTGGGCATTGAATTCGCCACTGCCGCGCACAGGGCGAGATTTCCGCGGCGAAGCTTTATGATA													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
QNRB1	TGATCACCACGCGACCTGGTTTTGTAGCGCATATATCACGAATACCAATCTAGCTACGCCAATTTTCGAAGTCGTGTTGGAAGTGTGAGCTGTGGGAACCGTTGGATAGGTGCCAGGTACT													
MansouriB1	TGATCACCACGCGACCTGGTTTTGTAGCGCATATATCACGAATACCAATCTAGCTACGCCAATTTTCGAAGTCGTGTTGGAAGTGTGAGCTGTGGGAACCGTTGGATAGGTGCCAGGTACT													
Consensus	TGATCACCACGCGACCTGGTTTTGTAGCGCATATATCACGAATACCAATCTAGCTACGCCAATTTTCGAAGTCGTGTTGGAAGTGTGAGCTGTGGGAACCGTTGGATAGGTGCCAGGTACT													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
QNRB1	GGGCGCGACGTTTCAGTGGTTTCAGATCTCTCCGGCGCGAGTTTTGACCTTCGACTGGCGAGCGCAACCTTCACACATTGCGATCTGACCAATTCGGAATTGGGTGACTTAGATATTCGGGCGTTGAT													
MansouriB1	GGGCGCGACGTTTCAGTGGTTTCAGATCTCTCCGGCGCGAGTTTTGACCTTCGACTGGCGAGCGCAACCTTCACACATTGCGATCTGCAATTCGGAATTGGGTGACTTAGATATTCGGGCGTTGAT													
Consensus	GGGCGCGACGTTTCAGTGGTTTCAGATCTCTCCGGCGCGAGTTTTGACCTTCGACTGGCGAGCGCAACCTTCACACATTGCGATCTGCAATTCGGAATTGGGTGACTTAGATATTCGGGCGTTGAT													
	521	530	540	550	560	568								
QNRB1	TTACAGGCGTTAGTTGGACACCTTGGCATCGCGGTGATTGGTTAG													
MansouriB1														
Consensus														

شكل ١٤ : Alignment ژن *qnrB1*

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
qnrB4	ATTGGCTGCCAGTTTTATGATCGAGAAAGTCAGAAAGGATGTAATTTAGTCGCGCTAACCTGAAGATGCCATTTTC													
MansouriB4	AGTTGTGATCTCTCCATGGCTGATTTACGGAATATCAATGCGCTGGGA													
Consensus	.....AGaTcTaATCTCTCCATGGCTGATTTACGGAATATCAATGCGCTGGGA													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
qnrB4	TCGAATTCGCCACTGCCGGGCGAAGGGTCAGATTTTCGGGCGCAGTTTTATGAATATGATCACCACCCGACCTGGTTTTGTAGCGCTATATCACCATTACCACTTAGCTACGCCACCTTTTC													
MansouriB4	TCGAATTCGCCACTGCCGGGCGAAGGGTCAGATTTTCGGGCGCAGTTTTATGAATATGATCACCACCCGACCTGGTTTTGTAGCGCTATATCACCATTACCACTTAGCTACGCCACCTTTTC													
Consensus	TCGAATTCGCCACTGCCGGGCGAAGGGTCAGATTTTCGGGCGCAGTTTTATGAATATGATCACCACCCGACCTGGTTTTGTAGCGCTATATCACCATTACCACTTAGCTACGCCACCTTTTC													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
qnrB4	AAAGTCGTAAGTGGAAAGTGCAGCTGTGGGAACCGCTGGATGGGTACTCAGGTGTGGGCGACAGTTTCAGTGGATCAGACCTCTCTGGGCGGAGTTTTATCCTTCGACTGGCGAGCAGCAAC													
MansouriB4	AAAGTCGTAAGTGGAAAGTGCAGCTGTGGGAACCGCTGGATGGGTACTCAGGTGTGGGCGACAGTTTCAGTGGATCAGACCTCTCTGGGCGGAGTTTTATCCTTCGACTGGCGAGCAGCAAC													
Consensus	AAAGTCGTAAGTGGAAAGTGCAGCTGTGGGAACCGCTGGATGGGTACTCAGGTGTGGGCGACAGTTTCAGTGGATCAGACCTCTCTGGGCGGAGTTTTATCCTTCGACTGGCGAGCAGCAAC													
	391	400	410	420	430	440	450	460						
qnrB4	GTTACGCACTGTGATTTGACCAATTCGGAATCGGGGATTTAGATATCCGCGGGGTTGATTTGCAGGGCG													
MansouriB4	GTTACGCACTGTGATTTGACCAATTCGGAATCGGGGATTTAGATATAGT													
Consensus	GTTACGCACTGTGATTTGACCAATTCGGAATCGGGGATTTAGATATaGcG.....													

شكل ١٥ : Alignment ژن *qnrB4*

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
QNR <i>S1</i>	ATGGAACCTACATCATCATATCGGCACCACTTTTACATTAAGACTTAAGTGATCTCACCTTCACCGCTTGACATTCATTCGCAGCGACTTCGACGTGCTAATCTGCGTGATACGACATTCG														
Mansour <i>iS1</i>	CCTAAGAAATCACATTAAGACTTAAGTGATCTCACCTTCACCGCTTGACATTCATTCGCAGCGACTTCGACGTGCTAATCTGCGTGATACGACATTCG														
Consensus	.....CaAagaATCACATTAAGACTTAAGTGATCTCACCTTCACCGCTTGACATTCATTCGCAGCGACTTCGACGTGCTAATCTGCGTGATACGACATTCG														
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
QNR <i>S1</i>	TCACCTGCAAGTTCATTGAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATGTCGCAGATCTTCGTGATGCAAGTTCCACCAATGCCAATTCGCGATGGCAAACTTCAGTAATGCCAATTGCTACGGTAT														
Mansour <i>iS1</i>	TCACCTGCAAGTTCATTGAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATGTCGCAGATCTTCGTGATGCAAGTTCCACCAATGCCAATTCGCGATGGCAAACTTCAGTAATGCCAATTGCTACGGTAT														
Consensus	TCACCTGCAAGTTCATTGAACAGGGTGATATCGAAGGCTGCCACTTTGATGTCGCAGATCTTCGTGATGCAAGTTCCACCAATGCCAATTCGCGATGGCAAACTTCAGTAATGCCAATTGCTACGGTAT														
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
QNR <i>S1</i>	AGAGTTCGCGTGTGATTTAAAGGGTGCCAACTTTTCCGAAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTATCGTATGTACTTTTGTCTAGCATTTATTTCTGGATGTAATCTTCTATGCCAATATGGAG														
Mansour <i>iS1</i>	AGAGTTCGCGTGTGATTTAAAGGGTGCCAACTTTTCCGAAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTATCGTATGTACTTTTGTCTAGCATTTATTTCTGGATGTAATCTTCTATGCCAATATGGAG														
Consensus	AGAGTTCGCGTGTGATTTAAAGGGTGCCAACTTTTCCGAAACAACTTTGCCCATCAAGTGAGTATCGTATGTACTTTTGTCTAGCATTTATTTCTGGATGTAATCTTCTATGCCAATATGGAG														
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
QNR <i>S1</i>	AGGGTTTGTTTAGAAAATGTGAGTTGTTTGAARAATCGCTGGATAGGAACGAACTAGCGGGTGCACTCACTGAAGAGTCAGACTTAAGTCGAGGTGTTTTTCCGAGATGTCTGGGGCAATTTAGCC														
Mansour <i>iS1</i>	AGGGTTTGTTTAGAAAATGTGAGTTGTTTGAARAATCGCTGGATAGGAACGAACTAGCGGGTGCACTCACTGAAGAGTCAGACTTAAGTCGAGGTGTTTTTCCGAGATGTCTGGGGCAATTTAGCC														
Consensus	AGGGTTTGTTTAGAAAATGTGAGTTGTTTGAARAATCGCTGGATAGGAACGAACTAGCGGGTGCACTCACTGAAGAGTCAGACTTAAGTCGAGGTGTTTTTCCGAGATGTCTGGGGCAATTTAGCC														
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
QNR <i>S1</i>	TACAGGGTGCCAAATTTATGCCACGCCGAACCTGACGGTTTAGATCCCCGCAAGTCGATACATCAGGTATCAAATTTGCAGCCTGGCAGCAGAACTGATCTCGAA-GCACTGGGTATTGTTGTTTATC														
Mansour <i>iS1</i>	TACAGGGTGCCAAATTTATGCCACGCCGAACCTGACGGTTTAGATCCCCGCAAGTCGATACATCAGGTATCAAATTTGCAGCCTGGCAGCAGAACTGATCTCGAAAGCAAGGAGGA														
Consensus	TACAGGGTGCCAAATTTATGCCACGCCGAACCTGACGGTTTAGATCCCCGCAAGTCGATACATCAGGTATCAAATTTGCAGCCTGGCAGCAGAACTGATCTCGAAAGCAAGGAGGA.....														
	651	658													
	-----														
QNR <i>S1</i>	CTGACTAA														
Mansour <i>iS1</i>															
Consensus	.....														

شکل ۱۶ : *qnrS* ژن Alignment

# فصل ششم

## بحث و پیشنهادات

## ۶-۱ بحث:

کلبسیلا پنومونیه پاتوژن فرصت طلبی می باشد که باعث عفونت های جدی نظیر اسهال، سپتی سمی، عفونت های مجاری ادراری و تنفسی می گردد که از میان این عفونت ها ، عفونت های ادراری ایجاد شده توسط این پاتوژن دارای شیوع بیشتری می باشند (۹۴). در این مطالعه نیز از ۲۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۱۰۶ (۵۳٪) ایزوله از عفونت های ادراری افراد بستری در بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران جدا شده است که این خود مصداقی بر این امر است که عفونت های دستگاه ادراری نسبت به سایر موارد از شیوع و درصد بالاتری برخوردار هستند. ایزوله های کلبسیلا پنومونیه در ایجاد عفونت های اکتسابی از جامعه نیز بسیار حائز اهمیت می باشند. در راس این عفونت ها می توان به آبسه های کبدی اشاره کرد که در سال های اخیر شیوع چشمگیری در برخی از کشورهای آسیایی بخصوص تایوان داشته است (۹۵). کوئینولون ها یکی از شایعترین عوامل ضد میکروبی جهت درمان عفونت های جدی ایجاد شده توسط کلبسیلا پنومونیه و سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه هستند (۹۶). البته پیدایش مقاومت به این دسته از آنتی بیوتیک ها، تصمیم گیری برای درمان را مشکل می کند و اغلب منجر به شکست درمان می شود (۹۷). در سال های اخیر مقاومت به کوئینولون ها بواسطه پلاسمید در بین ایزوله های انتروباکتریاسه در چندین مطالعه از سراسر دنیا گزارش شده است، اگر چه تعدادی از گزارشات شیوع ژن های *qnr* در ایزوله های انتروباکتریاسه در ایران، به تحقیقات محدودی محدود شده است (۹۸،۹۹). با توجه به اینکه از زمان تولید نالیدیکسیک اسید در سال ۱۹۶۲ به عنوان اولین داروی خانواده کوئینولون ها بیش از پنج دهه می گذرد و به دلیل اینکه از این دارو در همان ابتدا در درمان عفونت های ادراری استفاده شده است ، بنابراین انتظار می رود که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک از دیگر آنتی بیوتیک های خانواده کوئینولونی بالاتر باشد. بطور قابل ملاحظه ای ۵۸٪ و ۳۴/۵٪ از ایزوله ها مقاومت کامل و

حد واسط به نالیدیکیسید اسید و سیپروفلوکساسین داشتند. این یافته ها بالاتر از میزان دو مطالعه قبلی در ایران است. راعی و همکارانش میزان مقاومت کلبسیلا پنومونیه نمونه های ادرار را نسبت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکیسید اسید ۳۶/۲٪ و ۳۴/۱٪ گزارش کردند (۱۰۰). در مطالعه دیگری در ایران، زمانی و همکارانش میزان مقاومت گونه های کلبسیلا را به نالیدیکیسید اسید و سیپروفلوکساسین ۲۸/۵۷٪ و ۲۳/۸٪ گزارش کردند (۱۰۱). در سایر کشورها، در مطالعه ای که توسط Wang و همکارانش در چین انجام شد، از بین ۳۳۵ ایزوله اشرشیا کلی جدا شده، ۱۴۶ ایزوله (۴۳/۶٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند ولی از بین ۳۹۲ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۶۷ ایزوله (۱۷/۰۹٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند که این میزان مقاومت کمتر از مقدار مقاومت یافت شده در مطالعه حاضر است (۸۹). در مطالعه ای که Robicsek و همکارانش در امریکا بر روی ۳۱۳ نمونه انتروباکتریاسه انجام دادند، از بین ۱۰۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه، ۷۵ ایزوله (۷۰/۷٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند که این مقدار نیز بیشتر از میزان مقاومت به این داروها در مطالعه حاضر است (۱۰۲). در مطالعه ای که توسط Wang و همکارانش در امریکا انجام شد، از بین ۹۰۲۳ ایزوله بالینی اشرشیا کلی، ۳۷۶ ایزوله (۴/۲٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین و از بین ۴۰۰۲ ایزوله بالینی کلبسیلا پنومونیه، ۱۶۴ ایزوله (۴/۱٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند که بسیار کمتر از میزان یافت شده در مطالعه حاضر است (۱۰۳). در مطالعه ای که توسط Tolun و همکارانش در ترکیه انجام شد، از بین ۲۵۸ ایزوله اشرشیا کلی جدا شده از عفونت های ادراری ۱۳۷ ایزوله (۵۳/۱٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین و از بین ۵۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت های ادراری، ۱۷ ایزوله (۳۴٪) مقاوم به سیپروفلوکساسین گزارش شدند که این مقدار مقاومت با میزان یافت شده در مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۰۴). از اینرو بنظر می رسد پیدایش

ایزوله های مقاوم به عوامل آنتی باکتریال وسیع الطیف در بخش های بیمارستان های ما با استفاده نادرست و گسترده این آنتی بیوتیک ها مرتبط است.

مطالعه حاضر شیوع سطح بالایی از مقاومت به کوئینولون بواسطه پلاسمید (۳۹/۵٪) در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از چندین بیمارستان آموزشی در ایران را نشان می دهد. میزان شیوع مقاومت بواسطه پلاسمید در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه حاصل از مطالعه حاضر بالاتر از میزان شیوع گزارش شده توسط Kim و همکارانش از کره ۱۰٪ (۱۰۵)، Dahmen و همکارانش از تونس (۱۶٪) می باشد (۱۰۶). در مطالعه ای که توسط Wang و همکارانش در چین انجام شد، از ۶۷ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۸ ایزوله (۱۱/۹٪) حاوی ژن *qnr* بودند، همچنین در این مطالعه از ۱۴۶ ایزوله اشرشیا کلی مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۱۱ ایزوله (۷/۵٪) حاوی ژن *qnr* بودند که این مقدار بسیار کمتر از میزان یافت شده در مطالعه حاضر می باشد (۸۹). در مطالعه دیگری که Wang و همکارانش در امریکا انجام دادند، ۸ ایزوله (۱۱/۱٪) از ۷۲ ایزوله کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن *qnr* بودند و در ۳۸ ایزوله اشرشیا کلی مقاوم به سیپروفلوکساسین، ژن *qnr* یافت نشد، که میزان *qnr* یافت شده در این مطالعه نیز کمتر از فراوانی ژن های *qnr* در مطالعه حاضر می باشد (۱۰۳). در مطالعه ای که Jiang و همکارانش در چین انجام دادند، میزان ژن پلاسمیدی *qnr*، در ایزوله های اشرشیا کلی، ۵/۳٪ و در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه ۱۶/۲٪ گزارش شد که بازهم کمتر از میزان یافت شده در مطالعه حاضر است (۱۰۷)، اما فراوانی ژن پلاسمیدی *qnr* یافت شده در مطالعه ما هنوز کمتر از میزان یافت شده توسط Bouchakour و همکارانش از مراکش است که در آن ۵۰٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL، حاوی ژن *qnr* بودند (۹۲). در مجموع مطالعات

انجام شده در این زمینه نشان دهنده روند رو به افزایش در میزان مقاومت بواسطه پلاسمید در برابر کوئینولون در میان اعضای جنس انتروباکتریاسه باشد.

در این مطالعه، ۲۵٪ از ایزوله های حاوی ژن *qnr*، مقاومت سطح بالا به کوئینولون ها را نشان دادند، این در حالی است که ژن های پلاسمیدی *qnr* مقاومت سطح پایین به کوئینولون ها را موجب می شوند. این نتایج می تواند نشان دهنده این مساله باشد که الگوی مقاومت سطح بالا احتمالاً بدلیل سایر مکانیسم های مقاومت نظیر موتاسیون های کروموزومی باشد که در مطالعه حاضر بررسی نشده است. یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد که بیشترین ایزوله های کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن *qnr*، غالباً از بیماران بستری در بخش ICU جمع آوری شده است. بستری شدن طولانی مدت در بخش ICU، مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، بیماری زمینه ای مزمن، استفاده از تکنیک های تهاجمی و دستگاه های پزشکی آلوده بیماران را در معرض خطر عفونت با ایزوله های مقاوم قرار می دهد. در مطالعه حاضر ۲/۲۸٪، ۳/۷٪ و ۶/۱٪ از ایزوله های کلبسیلا پنومونیه غیر حساس به کوئینولون، حامل ژن های *qnrB1*، *qnrB4* و *qnrS1* به تنهایی و یا به صورت مشترک بودند. در مطالعه ای در ایران که توسط پاکزاد و همکارانش انجام شد، میزان ژن های *qnrA* و *qnrB* به ترتیب ۹ (۳۷/۵٪) و ۴ (۲۰/۸٪) در ایزوله های *E.coli* تولید کننده ESBI گزارش شد (۹۹). در مطالعه دیگری از ایران صبوچی و همکارانش میزان شیوع ژن *qnrA* (۲۵/۸٪)، *qnrB1* (۱/۱۷٪) و *qnrS* (۱/۱۷٪) را در بین گونه های سالمونلای تولید کننده ESBI، گزارش کردند (۱۰۸). در تایوان در مطالعه ای که Wu و همکارانش انجام دادند، ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه حامل ژن *qnrB4* (۳/۶٪)، *qnrS1* (۲/۸٪) و *qnrB2* (۲/۳٪) بودند (۱۰۹). در مطالعه ای در امریکا، Robicsek و همکارانش میزان شیوع ژن های *qnrA* (۱۴٪) و *qnrB* (۶٪) را در ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به سفتازیدیم نشان دادند (۱۰۲).



Dahmen و همکارانش از تونس نشان دادند که *qnrA* بیشترین میزان شیوع را در میان ایزوله های کلبسیلا پنومونیه دارد در صورتیکه *qnrB1* بیشترین میزان شیوع را در میان ایزوله های انتروباکتر کلوآکه دارد و پس از آن *qnrB2* و *qnrS1* قرار دارند (۱۰۶). بطور مشابه Jiang و همکارانش در چین میزان شیوع ژن ها را در میان ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL، ۸ ایزوله (۰.۸/۱) حامل ژن *qnrA*، ۴ ایزوله (۰.۴/۱) حامل ژن *qnrB* و ۴ ایزوله (۰.۴/۱) حامل ژن *qnrS* گزارش کردند (۱۰۷). در نهایت Wang و همکارانش در چین میزان شیوع ژن ها را در میان ایزوله های کلبسیلا پنومونیه تولید کننده ESBL، ۶۲ ایزوله (۰.۱۵/۱) حامل ژن *qnrS*، ۲۵ ایزوله (۰.۶/۱) حامل ژن *qnrB* و ۱۰ ایزوله (۰.۲/۴) حامل ژن *qnrA* گزارش کردند (۸۸).

Corkill و همکاران در سال ۲۰۰۵ در انگلستان با بررسی ۴۷ ایزوله انتروباکتریاسه مقاوم به سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم جدا شده از موارد باکتری می، شیوع ژن *qnrA* را در ایزوله های تحت بررسی ۳۲٪ گزارش کرده اند (۱۱۰). شیوع بالای ژن حاضر در مطالعه انگلستان نسبت به مطالعات مشابه می تواند به این دلیل باشد که مطالعه مذکور بر روی ایزوله های بدست آمده از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه که تحت شرایط فشار انتخابی بالا ناشی از مصرف بالای آنتی بیوتیک قرار داشته اند، انجام گرفته است.

Oktem و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه ۷۸ ایزوله انتروباکتریاسه (۳۴ ایزوله اشرشیا کلی و ۴۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه) ESBL مثبت را مورد بررسی قرار دادند: از این تعداد ۳۷ ایزوله (۰.۴۷/۴) به تنهایی به نالیدیکسیک اسید مقاوم بوده و تعداد ۳۹ ایزوله (۰.۷۸/۶) همزمان به سیپروفلوکساسین نیز مقاوم داشتند. در بین ایزوله های مقاوم به کینولون ۵ ایزوله (۰.۶/۳) حامل ژن *qnrA* بودند (۱۱۱).

از آنجا که دو مطالعه اخیر از نظر زمانی حدود یک دهه با مطالعه حاضر فاصله دارند، نتایج این مطالعات تایید کننده روند رو به افزایش مقاومت به کوئینولون ها و افزایش گسترش ژن های *qnr* می باشد. یافته های مطالعه حاضر همچنین نشان دادند که برخی از ایزوله های فاقد ژن *qnr* همچنان دارای مقاومت فنوتیپی به کوئینولون ها هستند که مقاومت فوق می تواند به دلیل وجود سایر مکانیسم های مقاومت به کوئینولون ها مانند جهش در آنزیم های هدف و یا وجود پمپ های افلاکس باشد.

## ۶-۲ نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر میزان شیوع بالای مقاومت به کوئینولون بواسطه پلاسمید حامل ژن *qnr* را در بین ایزوله های بالینی کلبسیلا پنومونیه در ایران تایید می کند. ظهور و گسترش چنین ارگانیسم های قابل انتقالی در مراکز پزشکی در سراسر کشور نه تنها باعث نگرانی در مورد سلامتی انسان ها می شود، بلکه مسائلی را در مورد چگونگی کنترل موثر عفونت و اقدامات برای جلوگیری از گسترش بیشتر این ارگانیسم های مقاوم در بخش های پزشکی ما در جهت دستیابی به یک درمان موفق آنتی بیوتیکی مطرح می کند. اطلاعات ما همچنین بر ضرورت ایجاد یک استراتژی کنترل عفونت مناسب و درمان آنتی بیوتیکی موثر تاکید دارد.

فراوانی بالای ژن های *qnr* در میان سویه های با اهمیت بالینی بویژه به دلیل حمل وابسته به پلاسمید آنها که انتقال و گسترش سریع آنها را تسهیل می نماید، بسیار حائز اهمیت بالینی می باشد. لذا لزوم بررسی های بیشتر با بهره گیری از تکنیک های مولکولی از نظر بررسی کامل الگوی ژنتیکی مقاومت، وجود برنامه های مراقبتی و نظارتی دقیق و اقدامات پیشگیرانه جدی را نشان می دهد.

در این مطالعه علیرغم حضور قابل توجه مقاومت پلاسمیدی *qnr* در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه، با توجه به میزان مقاومت بالای این ارگانیسم نسبت به مجموعه داروهای کوئینولونی بکار رفته در این مطالعه، پیشنهاد می شود که مقاومت با منشا کروموزومی نیز مورد بررسی قرار گیرد. همچنین نظر به میزان مقاومت بالا نسبت به کوئینولون ها در این مطالعه، پیشنهاد می شود سایر فاکتورهای دخیل از جمله حضور و نقش فاکتور *aac(6')/lb-cr* نیز بررسی شود.

#### تشکرو قدردانی

از شورای مرکزی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و معاونت محترم پژوهشی تقدیر می شود.

## فهرست منابع (References)

1. Murray PR, Holmes B, Aucken HM. *citrobacter, klebsiella, Enterobacter, serratia*, and other *Enterobacteriaceae*, in: Boriello SP, Murray PR, Funke G. Topley & Wilson's. 10th Edition. London: Hodder Arnold; 2005.1474 -1506.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Enterobacteriaceae*. BAILEY & SCOTT'S DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY,12th Edition. Houston Texas, MOSBY ELSEVIER,2007;323-333.
3. Hsueh CT, Chin JC, Yu YY, Chen HC, Li WC, Shen MC, *et al*. Genetic analysis of the nitrogen fixation system in *Klebsiella pneumoniae*. Sci Sin.1977;20(6):807-17.
4. Huang H, Gong CS, Tsao GT. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Appl Biochem Biotechnol.2002;98-100:687-98.
5. Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. Int J Antimicrob Agents.2007;30(5):385-9.
6. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1988;11(4):589-603.
7. Hansen DS, Skov R, Benedí JV, Sperling V, Kolmos HJ. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. Clin Microbiol Infect. 2002;8(7):397-404.
8. Kamlesh J, Radsak K, Mannheim W. Differentiation of the *Oxytocum* group from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol.1974;24(4):402-407.

9. Bagley S, Seidler RJ, Brenner DJ. *K. planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. *Curr Microbiol.* 1981;6(4):105-109.
10. Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. *Int J Syst Bacteriol.* 1981; 31(2):116-127
11. Ferragut C, Izard D, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *Int J Syst Bacteriol.* 1983; 33(2):133-142.
12. Sakazaki R, Tamura K, Kosako Y, Yoshizaki E. *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine positive *K. oxytoca*. *Curr Microbiol.* 1989;18(4):201-206.
13. Gavini F, Izard D, Grimont PAD, Beji A, Ageron E, Leclerc H. Priority of *K. planticola* Bagley, Seidler, and Brenner 1982 over *K. trevisanii* Ferragut, Izard, Gavini, Kersters, DeLey, and Leclerc. *Int J Syst Bacteriol.* 1983;36(2):486-488.
14. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with 201 description of *R. ornithinolytica* comb. nov., *R. terrigena* comb. nov. and *R. planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(3): 925-932.
15. Alves MS, Dias RC, De Castro AC, Riley LW, Moreira BM. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2006 October;44(10):3640–3646.
16. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, *et al.* Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):160-6.

17. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended- spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*.2006;50(4):1257-62.
18. Brisse S, Grimont F, Grimont P.The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes*, 3th Edition.Springer,2006;159-196
19. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603.
20. Feldman C, Ross S, Mahomed AG, Omar J, Smith C. The aetiology of severe community-acquired pneumonia and its impact on initial, empiric, antimicrobial chemotherapy. *Respir Med*.1995;89(3):187-92.
21. Rennie RP, Anderson CM, Wensley BG, Albritton WL, Mahony DE. *Klebsiella pneumoniae* gastroenteritis masked by *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol*. 1990;28(2):216-9.
22. Fang FC, Sandler N, Libby SJ. Liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):991-2.
23. Lederman ER, Crum NF. Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(2):322-31.
24. Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. Investigation of the putative virulence gene magA in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: magA is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 11):1111-3.

25. Fung CP, Chang FY, Lee SC, Hu BS, Kuo BI, Liu CY, Ho M, Siu LK. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis?. Gut. 2002;50(3):420-4.
26. Chung DR, Lee SS, Lee HR, Kim HB, Choi HJ, Eom JS, *et al.* Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* in Korea. J Infect. 2007;54(6):578-83.
27. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. Clin Infect Dis. 2004;39(11):1654-9.
28. Kim JK, Chung DR, Wie SH, Yoo JH, Park SW. Risk factor analysis of invasive liver abscess caused by the K1 serotype *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(1):109-11.
29. Tang LM, Chen ST, Hsu WC, Chen CM. *Klebsiella* meningitis in Taiwan: an overview. Epidemiol Infect. 1997;119(2):135-42.
30. Holder CD, Halkias D. Relapsing, bacteremic *Klebsiella pneumoniae* meningitis in an AIDS patient. Am J Med Sci. 1988;295(1):55-9.
31. Ohmori S, Shiraki K, Ito K, Inoue H, Ito T, Sakai T, Takase K, *et al.* Septic endophthalmitis and meningitis associated with *Klebsiella pneumoniae* liver abscess. Hepatol Res. 2002;22(4):307-312.
32. Yanagawa T, Nakamura H, Takei I, Maruyama H, Kataoka K, Saruta T, *et al.* [*Klebsiella pneumoniae* meningitis associated with liver abscess: a case report]. Jpn J Antibiot. 1989;42(10):2135-40.

33. Seale M, Lee WK, Daffy J, Tan Y, Trost N. Fulminant endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis: imaging findings. *Emerg Radiol.* 2007;13(4):209-12.
34. Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis.* 2007;45(3):284-93.
35. Nguyen Thi PL, Yassibanda S, Aidara A, Le Bouguénec C, Germani Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):135-7.
36. Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, Mori M, Kido N, Ito H, *et al.* Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun.* 1991;59(6):2043-50.
37. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 2002;70(5):2583-90.
38. Lin JC, Chang FY, Fung CP, Xu JZ, Cheng HP, Wang JJ, *et al.* High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes Infect.* 2004;6(13):1191-8.
39. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2004;72(12):7107-14.



40. Topley and Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. Bacteriology: Enterobacteriaceae. 10th edition. 2006; pp:1476-1483.
41. Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llomp Alberti C.M. and Bengoechea J.A Capsule Polysaccharide Mediates bacterial resistance to Antimicrobial. Infect Immune December. 2004;72(12):7107-7114.
42. William P., Lambert P.A. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. J.Gen.Microbial. 1983; 129:2181-2191.
43. Roberts I.S., Saunders F.K. Bacterial capsule and interaction with complement and phagocytes. Biochem. Soc. Trans. 1989; 17:462-464.
44. Ciurana B. and Tomas J.M. Role of polysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumonia* to nonimmune serum. Infect.Immune. 1987. 55;2741:2746.
45. Tomas J.M., Benedi V.J. Role of capsule and O antigen in resistance of *klebsiella pneumonia* to serum bacterial activity. Infect. Immune. 1989. 54;85-89.
46. Evrard B, Balestrino D, Dosgilbert A, Bouya-Gachancard JL, Charbonnel N, Forestier C, et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2010;78(1):210-9.
47. Grimont P.A.D., Grimont F., Genus *Klebsiella* In: Brenner D.J., Krieg N.R, Staley J.T. Bergey's manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B : The Gammaproteobacteria. New York: Springer-Verlag. 2005; pp: 685-698.

48. Podschun R, Sahly H. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. Zentralbl Hyg Umweltmed.1991;191(1):46-52.
49. Haward B.J. and Klass J.Clinical and pathogenic Microbiology, vol.Mosby. Washington DC. 1987.
50. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. Infect Immun. 2009;77(11):5016-24.
51. Bortz DM, Jackson TL, Taylor KA, Thompson AP, Younger JG. *Klebsiella pneumoniae* flocculation dynamics. Bull Math Biol. 2008;70(3):745-68.
52. Murray P.R. Manual of Clinical Microbiology. 8ed, vol.1.ASM Press,WashingtonDc.2003.
53. Alexander C, Rietschel ET.Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res. 2001;7(3):167-202.
54. Nassif X. and sansonetti P.J. Correlation of the virulence of *klebsiella pneumonia* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect.Immun. 1986; 54:603-608.
55. Bachman MA, et al. *K. pneuomoniae* Yersiniabctin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect Immun. 2011;79(8):3309-3316.
56. Joppa B., Li S., Cole S. and Gallagher S. Pulsed-Field Electrophoresis for Separation of Large DNA.2006;1-7.

57. Johnson A.P., Wienbern M.J. Outbreaks of infection in two UK hospital caused by a strain of *Klebsiella pneumonia* resistant to cefotaxime and ceftazidime. J. Hosp.Infect. 1992; 20:97-103.
58. Podschun R. and Ullmann U. Bacteriocin typing of a *Klebsiella pneumoniae* spp.isolated from different sources. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1996; 198:258-64.
59. Gierczynski R., Jagielski M., Rastawicki W. and Kaluzewski S. Multiplex-PCR Assay for Identification of *Klebsiella pneumonia* Isolates Carring the cps Loci for k1 and k2 Capsule Biosynthesis. Journal of Microbiology. 2007; 56(3);153-156.
60. Yu W.L., Fung C.P., Ko W.C., Chang K.C., Lee C.C. Polymerase Chain Reaction Analysis for Detection capsule serotypes k1 and k2 *klebsiella pneumonia* Causing Abscesse of the Liver and Other Sites. The Journal of Infections disease.2007; 195: 1235-6.
61. Turton J.F., Englander H., Gabriel S.N., Turton S.E., Kaufmann M.E., Pitt T.L.Genetically similar isolates of serotype K1 causing liver abscesses in three continents. Journal of Medical Microbiology. 2007;56:593-597.
62. Balfanz j., Rautenberg P. and Ullmann U. Molecular mechanisms of action of bacterial exotoxins. Zentralbl Bakteriol. 1996; 284:170-206.
63. Buffenmeyer C.L., Ruchek R.R. Bacteriocin ( Klebocin) sensivity typing of Klebsiella. J. Clin.Microbial. 1976; 4:239-244.
64. Coovadia Y.M., Johnson A.P. Multiresistant *Klebsiella pneumonia* in aneonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. J.Hosp.Infect. 1992; 20:197-205.

65. Lianes C., Kirch gesner V. and Plesiat P. Propagation of TEM and PES-Type beta-Lactamase and among Amoxicillin-Resistant *Salmonella spp.* isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.1999; 43(10):2430-2436.
66. Saeed Emami, Abbas Shafiee and Alireza Foroumadi. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments., *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2005) 3: 123-136.
67. Vincent T. Andriole,. The Quinolones: Past, Present, and Future,. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:S113–9.
68. Peter Ball., Quinolone generations: natural history or natural selection, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2000) 46, Topic T1,17-24
69. Monique I. Andersson and Alasdair P. MacGowan,. Development of the quinolones,. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 51, *Suppl. S1*, 1–11.
70. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. *Medical Microbiology*. United States. 25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010 ;Chapter15,Page219.
71. George A. Jacoby,. Mechanisms of Resistance to Quinolones,. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:S120–6.
72. Rahman MM, Haq JA, Hossain MA, Sultana R, Islam F, Islam AHPrevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24(5):508-10.
73. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(9):597-602.

74. UpToDate Inc. May 2011:<http://www.uptodate.com>.
75. World Health Organization. May 2011:<http://www.who.int>.
76. Tamma PD, Cosgrove SE. Antimicrobial stewardship. *Infect Dis Clin North Am*. 2011;25(1):245-60.
77. Xizhou Guan, Xinying Xue, Yuxia Liu, Jing Wang, Yong Wang, Jianxin Wang, Kaifei Wang, Hong Jiang, Lina Zhang, Bing Yang, N Wang and Lei Pan, , Plasmid-mediated quinolone resistance – current knowledge and future perspectives. *Journal of International Medical Research* 41(1) 20–30, The Author(s) 2013.
78. Yu-Kuo Tsai, Chang-Phone Fung, Jung-Chung Lin, Jiun-Han Chen, Feng-Yee Chang, Te-Li Chen and L. Kristopher Siu. *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Apr. 2011.
79. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* doi:10.1128/CMR.00117-14.18 March 2015.
80. Partridge, Sally R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae, *Molecular Diagnostics in Microbiology*, Volume 47 - Issue 3, April 2015.
81. José Manuel Rodríguez-Martínez, María Eliecer Cano, Jorge Calvo, Álvaro Pascual & Luis Martínez-Martínez, Plasmid-mediated quinolone resistance, *Microbial Drug Resistance*, Doi: 10.2217/ebo.12.362, Pages 106-121, December 2013.
82. Elena Ruiz, Yolanda Sáenz, Myriam Zarazaga<sup>1</sup>, Rosa Rocha-Gracia, Luis Martínez-Martínez, Guillaume Arlet and Carmen Torres, *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*: genetic environments and plasmid and chromosomal

location, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, doi:10.1093/jac/dkr548 Advance Access publication 4 January 2012.

83. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis. 2003;36(Suppl 1):S11-23.
84. Jeong HS, Bae IK, Shin JH, Jung HJ, Kim SH, Lee JY,. Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance and Its Association with Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in Enterobacteriaceae. Korean J Lab Med. 2011 Oct;31(4):257-64.
85. Laurent Poirel, Cé cile Leviandier, and Patrice Nordmann. Prevalence and Genetic Analysis of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae Isolates from a French University Hospital. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Dec. 2006, p. 3992–3997, American Society for Microbiology.
86. Lin CJ, Siu LK, Ma L, Chang YT, Lu PL. Molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Division of Infectious Diseases, National Health Research Institutes, Miaoli County, Taiwan. Microb Drug Resist. 2012 Feb;18(1):52-8. doi: 10.1089/mdr.2011.0060. Epub 2011 Oct 24.
87. Rama Narayana Deepak,1MBBS, FRCPA, FAMS, Tse Hsien Koh,1FRCPATH, FRCPA, D(ABMM), Kian Sing Chan,1MBBS. Plasmid-mediated Quinolone Resistance Determinants in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Large Singapore Hospital. Department of Pathology, Singapore General Hospital, Singapore.
88. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H, et al. Occurrence of qnr-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC-type b-

- lactamase from five pediatric hospitals in China. *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Jun; 283(1):112-6.
89. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H,. Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infectious Diseases* 2008, 8:68.
  90. Lavilla S, González-López JJ, Sabaté M, García-Fernández A, Larrosa MN, Bartolomé RM, Carattoli A, Prats G. Prevalence of qnr genes among extended-spectrum b-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(2):291–295.
  91. Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E, Dasilva GJ, Walsh T, Mendo S. First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both qnrA and qnrB genes in Portugal. *Intern J Antimicrob Agents* 2010;35(6):584–586.
  92. Bouchakour M, Zerouali K, Gros Claude JD, Amarouch H, El Mdaghri N, Courvalin P, Timinouni M. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(12):799-803.
  93. The Prevalence of Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Strains Isolated In Community- and Hospital-Acquired Infections in Teaching Hospitals of Hamadan, West of Iran. *J Res Health Sci.* 2013; 13(1): in press.
  94. Brisse S.,Fever C.,Passet V.,Jeanjean S.,Tournebise R.,Diancourt L. Virulent Colones of *klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLOS ONE.* 2009;4(3):e498.

95. Nordman P.,Cuzen G., Nass Th. The real threat of klebsiella pneumonia carbapenemase producing bacteria.Lancet Infect Diss.2009;9:228-236.
96. Emami S, Shafiee A, Foroumadi A. Quinolones: recent structural and clinical developments. Iran J Pharm Res. 2010; 4: 123–136.
97. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb Biotechnol. 2009; 2:40–61.
98. Saboohi R, Rajaei B, Sepehri Rad N, Razavi MR, Aghasadeghi MR, Moshiri A, et al. Molecular detection and association of QnrA, QnrB, QnrS and blaCMY resistance genes among clinical isolates of Salmonella spp. in Iran. Adv Microbiol. 2014; 4: 63–68.
99. Pakzad I, Ghafourian S, Taherikalani M, Sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M, et al. qnr prevalence in extended spectrum b-lactamases (ESBLs) and none-ESBLs producing Escherichia coli isolated from urinary tract infections in central of Iran. Iran J Basic Med Sci. 2011; 14: 458–464.
100. Raei F, Eftekhari F, Feizabadi MM. Prevalence of quinolone resistance among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7: e10887.
101. Zamani A, Yousefi Mashouf R, Ebrahimzadeh Namvar AM, Alikhani MY. Detection of *magA* gene in *Klebsiella* spp. isolated from clinical samples. [Iran J Basic Med Sci](#). 2013; 16: 173–176.
102. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2872–4.



103. Minggu Wang, Daniel F. Sahm, George A. Jacoby and David C. Hooper, Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the qnr Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48(4):1295. DOI:10.1128/AAC.48.4.1295-1299.2004.
104. Tolun V1, Küçükbasmaci O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Anđ-Küçüker M, Anđ O, Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains, *Clinical Microbiology and Infection* 2004 Jan; 10(1):72-5.
105. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 639–645.
106. Dahmen S, Poirel L, Mansour W, Bouallègue O, Nordmann P. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1019–23.
107. Yan Jiang, Zhihui Zhou, Ying Qian, Zeqing Wei, Yunsong Yu, Songnian Huand Lanjuan Li1, Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(60)-Ib-cr in extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2008) 61, 1003–1006.
108. Saboohi R, Rajaei B, Sepehri Rad N, Razavi MR, Aghasadeghi MR, Moshiri A, et al. Molecular detection and association of QnrA, QnrB, QnrS and blaCMY resistance genes among clinical isolates of *Salmonella* spp. in Iran. *Adv Microbiol* 2014; 4: 63–8.

109. Wu JJ1, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1223–7.
110. Corkill JE, Anson JJ, Hart CA. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(3): 1115–17.
111. Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, GUR D. QnrA prevalence in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61(5): 13-17.

## ضمیمه

### ضمیمه ۱

تهیه نیم مک فارلند: استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریوم به روش زیر تهیه می شود :

۱) ۰/۵ میلی لیتر از کلرور باریوم (BACL) ۰/۰۴۸ mol/l ( $W/V BaCl_2 \cdot 2H_2O$  ۱/۷۵ / ۱٪) رابه ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۰/۱۸ mol/l (1% V/V) اضافه کنید و با همزدن مداوم سوسپانسیون بدست آورید.

۲) چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری ۱ سانتی متر، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

۳) سوسپانسیون سولفات باریوم باید به مقدار ۴-۶ ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

۴) درب این لوله ها باید محکم بسته شوند و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری گردند.

۵) استاندارد سولفات باریوم قبل از هر بار استفاده باید به شدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد .

۶) استاندارد سولفات باریوم باید به صورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

ضمیمه ۲

TBE بافر: ۵۴ گرم تریس را با ۲۷/۵ گرم بوریک اسید در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA (۰/۵ مولار) به آن اضافه کرده و حجم را به یک لیتر می رسانیم.

ضمیمه ۳

EDTA (۰/۵ مولار) : ۱۸/۱۶ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و PH را با استفاده از NaOH به ۸ رسانده و سپس توسط اتوکلاو استریل می گردد.

# Prevalence of plasmid-mediated quinolone-resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from patients in hospitals of Tehran and Qazvin

---

## Abstract

### Background and purpose:

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen that can causes nosocomial infections such as urinary tract infections, pneumonia, septicemia and soft tissue infections. Studies have shown that quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates are growing worldwide and associated with the treatment failure in the hospital settings.

### Materials and Methods:

A total of 200 *K. pneumoniae* isolates were collected from several teaching hospitals of Tehran and Qazvin provinces during a period of 2011 to 2013. The bacterial identification was done using standard laboratory methods. All isolates were screened for quinolone resistance by agar disk diffusion method as recommended by clinical laboratory of standards Institute (CLSI). The MIC was determined for ciprofloxacin by agar dilution method according to CLSI guideline. PCR and sequencing was performed for detection of *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes among quinolone-resistant isolates .

### Results:

Out of 200 isolates of *Klebsiella pneumoniae*, 124 (62%) isolates were non-susceptible to quinolone compounds used in this study among those 49(39.5%) isolates were positive for *qnr* genes. PCR and sequencing showed that 35 isolates (28.2%) carried *qnrB1* gene, 9 isolates (7.3%) carried *qnrB4* gene and 2 isolates (1.61%) carried *qnrS1* gene. *QnrB1* were co-exist with *qnrB4* in 3 (2.4%) isolates. *QnrA* was not found in this study.

### Conclusions:

Considering the high prevalence of plasmid mediated quinolone in the studied hospitals, early identification of these resistant isolates and following of them is essential to prevent further speared. Furthermore, use of an appropriate treatment strategies and logical and rational antibiotics usage in our hospitals is also important.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, quinolones resistance , *qnr*



**Qazvin University of Medical Sciences**

**School of Medicine**

**A Thesis Submitted for M.Sc Degree**

**Title:**

**Frequency of qnr-mediated fluoroquinolone resistant among *Klebsiella pneumoniae* isolated in clinical samples collected from the admitted patients in educational Qazvin & Tehran hospitals**

**Supervisor:**

**Dr.Amir Peymani**

**Advisor:**

**Dr.Taghi Naserpour**

**By:**

**Leila Nikouei**

